

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. Ruzicka

In-vitro-Verfahren
in der Diagnostik
einer Sensibilisierung vom Soforttyp
gegen *Cannabis sativa L.*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Astrid Elster

aus Wertingen
2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Przybilla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wilhelm Stolz
Priv. Doz. Dr. Markus Backmund

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. med. F. Rueff

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	7
1.1 Geschichtliches	9
1.1.1 <i>Cannabis</i> als Rohstoff für Faserprodukte, Nahrungs- und Arzneimittel	9
1.1.2 <i>Cannabis</i> als Rohstoff für Rauschmittel	12
1.2 Botanik	14
1.2.1 Herkunft	14
1.2.2 Anbau	14
1.2.3 Morphologie der <i>Cannabis</i> -Pflanze	16
1.2.4 Inhaltsstoffe der <i>Cannabis</i> -Pflanze	18
1.2.4.1 Pharmakologische Inhaltstoffe und deren Wirkung bzw. Anwendung	18
1.2.4.2 Ernährungsphysiologisch bedeutsame Bestandteile und deren Metabolisierung	22
1.2.4.3 <i>Cannabis</i> -Fasern und ihre heutige Verwendung	24
1.3 Allergische Reaktionen vom Soforttyp I	26
 2. Fragestellung	 28
 3. Material	 29
3.1 <i>Cannabis</i>	29
3.2 Patienten(seren)	29
 4. Methoden	 31
4.1 Untersuchungen mit <i>Cannabis</i>	31
4.1.1 Herstellung von nativen Proteinextrakten aus dem Untersuchungsmaterial	31
4.1.2 Proteinbestimmung in <i>Cannabis</i> -Blättern, –Blüten und -Samen	31
4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
4.1.4 Unspezifische Proteinfärbung elektrophoretisch getrennter Gele	33
4.1.4.1 Silberfärbung	33
4.1.4.2 Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau	34
4.1.5 Westernblot	34
4.1.6 Immunoblot (Immundetektion)	35
4.1.7 Biotinylierung	35

4.1.8	Herstellung der CAPs für die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen <i>Cannabis</i>	36
4.2	Bestimmung verschiedener IgE-Antikörper im Blutserum	36
4.2.1	Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper im Blutserum gegen <i>Cannabis</i> mittels CAP-FEIA	36
4.2.2	Bestimmung des Gesamt-IgE-Gehalts im Blutserum mittels ImmunoCAP	38
4.3	Korrelationen der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper im Serum gegen unterschiedliche Allergene	38
4.4	CAP-Inhibition	39
5.	Ergebnisse	40
5.1	Klinische Daten der Patienten	40
5.2	Proteinbestimmung in den <i>Cannabis</i> -Extrakten	43
5.3	Proteinmuster der <i>Cannabis</i> -Extrakte nach Silberfärbung und Färbung mit CBB	43
5.4	Immunoblotuntersuchung zur Charakterisierung der <i>Cannabis</i> -Allergene	48
5.5	Charakterisierung der Seren anhand spezifischer IgE-Antikörper gegen verbreitete Allergenträger	55
5.5.1	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene aus <i>Cannabis</i> -Blättern	55
5.5.2	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene aus <i>Cannabis</i> -Blüten	55
5.5.3	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene der Hausstaubmilbe <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	56
5.5.4	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene einer Mischung von Pollen frühblühender Gräser	56
5.5.5	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Pollenallergene der Birke	57
5.6	Korrelationen der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper im Serum gegen verschiedene Allergene	57
5.6.1	Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von <i>Cannabis</i> -Blättern bzw. -Blüten und von <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	58
5.6.2	Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von <i>Cannabis</i> -Blättern bzw. -Blüten und von Pollen frühblühender Gräser	59
5.6.3	Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von <i>Cannabis</i> -Blättern bzw. -Blüten und von Birkenpollen	61
5.6.4	Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von <i>Cannabis</i> -Blättern und -Blüten	62

5.7	Inhibitionstests	63
5.7.1	Inhibition des Gräserpollen-CAP durch <i>Cannabis</i> -Blütenallergene	64
5.7.2	Inhibition des Birkenpollen-CAP durch <i>Cannabis</i> -Blütenallergene	66
5.7.3	Inhibition des <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP durch Gräserpollen- oder Birkenpollen-allergene	67
5.7.4	Inhibition des <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP durch Gräserpollen- oder Birkenpollen- oder <i>Cannabis</i> -Samenallergene	69
6.	Diskussion	70
6.1	Sensibilisierung und Allergie durch <i>Cannabis</i> : Was ist bisher bekannt?	70
6.2	Aufbereitung des Materials	73
6.3	Spezifische IgE-Antikörper gegen <i>Cannabis</i>	73
6.4	Charakterisierung der <i>Cannabis</i> -Allergene	74
6.5	Kreuzreaktionen zwischen <i>Cannabis</i> -Allergenen und Allergenen von Gräser- bzw. Birkenpollen	78
7.	Zusammenfassung	83
8.	Anhang	86
8.1	Methoden	86
8.1.1	Testkits und Reagenzien	86
8.1.2	Geräte	87
8.1.3	Verbrauchsmaterialien	87
8.1.4	Gewinnung der Patientenseren	88
8.1.5	Proteinextraktion	88
8.1.6	Bestimmung des Proteingehalts	89
8.1.7	Gelelektrophorese	90
8.1.7.1	Probenvorbereitung	90
8.1.7.2	SDS-PAGE	91
8.1.8	Unspezifische Proteinfärbung elektrophoretisch getrennter Gele	94
8.1.8.1	Silberfärbung	94
8.1.8.2	Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau	95
8.1.9	Westernblot	96
8.1.10	Immunoblot	98

8.1.11 Biotinylierung	99
8.1.12 CAP-Inhibition	101
8.1.12.1 Autoinhibition	102
8.1.12.2 Fremdinhibition	102
8.2 Serenprofile der Patienten	107
8.3 Literaturverzeichnis	108
8.4 Abbildungsverzeichnis	119
8.5 Tabellenverzeichnis	120
9. Danksagung	121
10. Lebenslauf	122

*„Nichts ist so stark wie eine Idee,
deren Zeit gekommen ist.“
(Viktor Hugo 1802-1885)*

1. Einleitung

Cannabis – zu deutsch Hanf - wird weltweit konsumiert und gilt unter Benutzern als "weiche Droge". *Cannabis* wird als **Marihuana** – getrocknete und zerkleinerte Blätter und Blüten – bzw. als **Haschisch** – Extrakt aus zusammengepressten Harzdrüsen - der Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. [1, 2] gehandelt. Der wesentliche psychoaktive Hauptwirkstoff, der ausschließlich in *Cannabis* vorkommt, ist das 9-Tetrahydrocannabinol, das THC, eine niedermolekulare aromatische Verbindung mit der Summenformel $C_{21}H_{30}O_2$. *Cannabis* wird heutzutage vermutlich von mehr Menschen konsumiert als jemals in der Vergangenheit, und das, obwohl der Umgang mit *Cannabis* inzwischen viel strenger geahndet wird. In Holland werden zwar Besitz und Konsum kleiner Mengen *Cannabis* toleriert [3], in Deutschland jedoch wird der Umgang mit *Cannabis* nach dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG) und damit auch der Handel strafrechtlich verfolgt [4]. Es darf dennoch von einer erheblichen Anzahl an (illegalen) Nutzern ausgegangen werden. In der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland haben fast zwanzig Prozent Erfahrungen mit *Cannabis* [5] und in zwei Jahrzehnten hat sich die Zahl der *Cannabis*-bezogenen Straftaten verdreifacht [6].

In den vergangenen Jahren wurde die Freigabe von *Cannabis* auch in Deutschland gefordert und seit 2011 sind *Cannabis*-haltige Schmerzmittel als Medikamente zugelassen [7]. Nach Spanien, Großbritannien, Dänemark und Schweden wird die Freigabe für 2012 auch in Italien, Tschechien und Österreich erwartet.

Inzwischen darf *Cannabis* wieder als industrielle Nutzpflanze in Form rauschmittelarmer Sorten angebaut werden; Bestandteile der THC-armen *Cannabis*-Pflanze werden auch zur Produktion von Nahrungsmitteln eingesetzt. Hier sind die ungesättigten Fettsäuren und die essenziellen Aminosäuren ernährungsphysiologisch besonders wertvoll (vgl. Abschnitt 1.2.4.2). Aufgrund seiner Materialeigenschaften eignet sich der drogenarme Nutzhanf auch zur Herstellung zahlreicher Gegenstände des alltäglichen Bedarfs (vgl. Abschnitt 1.2.4.3). Die Nachfrage nach rauschgiftarmen *Cannabis*-Produkten ist im Vergleich zum illegalen Drogenkonsum jedoch vergleichsweise gering.

Grundsätzlich ist die breite Exposition gegenüber einer neuen Substanz immer eine Art Experiment. Toxikologische, aber auch immunologische Risiken zeigen sich oft erst bei breiterem Einsatz einer Substanz. Ein Beispiel für eine allergologische Problematik, die durch intensive Allergenexposition vor zwanzig Jahren eintrat, war die Naturlatexallergie. Nach Beginn der HIV-Epidemie erfolgte ein breiter Einsatz von medizinischen Einmalhandschuhen und Kondomen. Während bis dahin nur sporadisch von einer Allergie vom Soforttyp gegen Naturlatex berichtet wurde [8, 9], kam es schließlich zu einer epidemischen Zunahme von Sensibilisierungen gegen Naturlatex im Gesundheitswesen [10].

Während die Toxikologie der *Cannabis*-Pflanze recht gut untersucht ist, ist über ihre möglichen immunologischen und allergologischen Wirkungen wenig bekannt. Es wird beobachtet, dass sich beim Rauchen von *Cannabis* häufig Augen und Nasen röten, z.T. auch allergischer Schnupfen oder Asthma auftreten. Es kann vermutet werden, dass diese Symptome durch eine IgE-vermittelte Sensibilisierung induziert werden. Der erste dokumentierte Fall einer Soforttypreaktion nach dem Rauchen einer Marihuanazigarette wurde 1971 von LISKOW [11] beschrieben. Obwohl Marihuana hauptsächlich geraucht wird, kann *Cannabis* – verarbeitet in Nahrungsmitteln – neben den gewünschten Rauschzuständen – auch auffällige gastrointestinale Symptome, allergische Schockzustände und Nierenversagen hervorrufen [12, 13, 14, 15, 16]. So könnte unter Umständen auch von einem rauschgiftarmen Industriehanf die Gefahr einer allergischen Reaktion ausgehen.

Es stellt sich die Frage, ob mit dem steigenden Umsatz an *Cannabis*-Produkten ungewollt – ähnlich wie bei Naturlatexallergenen – ein "Massenversuch" stattfindet, bei dem sich eine bisher nicht erkannte allergene Potenz von *Cannabis*-Proteinen bemerkbar macht. Dies betrifft sowohl mögliche Nutzer von *Cannabis*-Produkten als auch Personen, die mit der Erzeugung oder Verarbeitung von *Cannabis* beschäftigt sind.

1.1 Geschichtliches

1.1.1 *Cannabis* als Rohstoff für Faserprodukte, Nahrungs- und Arzneimittel

Cannabis gehört zu den wertvollen und vielfältig zu nutzenden Kulturpflanzen und hat eine sehr wechselhafte Geschichte hinsichtlich ihrer wirtschaftlichen Bedeutung erfahren [17]. Wann die Menschen begannen, *Cannabis* zu nutzen oder anzubauen, ist unbekannt. Wo immer sich Menschen ansiedelten und Ackerbau betrieben, findet sich auch bald *Cannabis*. Die ursprüngliche Heimat von *Cannabis* dürften die gemäßigten und warmen Regionen Asiens gewesen sein [18]. Die alten Chinesen nannten ihr Land "Erde des Hanfes und des Maulbeerbaumes", und das chinesische Schriftzeichen für Hanf ist "Ma", was zugleich "Mensch" bedeutet [19]. Auch der Name Bangladesch leitet sich von "bangh" (Hanf), "la" (Land) und "desch" (Mensch) her [20]. Die Griechen erinnerte die Pflanze vom Aussehen her an Rohrpflanzen, weshalb sie sie - nach dem griechischen Wort für "Rohr" (kanna) - "kannabis" nannten, eine Benennung, die sich in der latinisierten Form bis heute erhalten hat. Auch die entsprechenden europäischen Bezeichnungen (z.B. engl. „hemp“, holl. „hennep“, franz. „chanvre“, ital. „canapa“) leiten sich von „Hanf“ bzw. von „*Cannabis*“ ab [21].

Die früheste archäologische Spur von *Cannabis* findet sich 10000 v. Chr. auf dekorierten Tonscherben in den Überresten einer Steinzeitsiedlung auf der Insel Taiwan [22]. Der erste geschichtlich bekannte Webstoff war offenbar aus *Cannabis*, dessen Verarbeitung schon im 8. Jahrtausend v. Chr. begann [23]. Archäologische Funde in Ostasien, Nordchina und Sibirien belegen, dass *Cannabis* bereits vor 6000 Jahren zu Schnüren, Fischernetzen und Kleidung verarbeitet wurde, und dass praktisch jede Stadt der Welt eine Industrie hatte, die Seile aus *Cannabis* herstellte [24]. Schon ab dem 8. Jahrhundert n. Chr. ermöglichten salzwasserfeste Taue und Segel aus *Cannabis*-Fasern den Wikingern die Meere zu befahren [25]. In einer Grabstätte der Chou-Dynastie (1122-249 v. Chr.) wurde 1972 ein Textilfragment aus *Cannabis*-Fasern entdeckt - mit 3000 Jahren das älteste *Cannabis*-Produkt Chinas [26]. Der früheste europäische Fund eines voll aufbereiteten *Cannabis*-Gewebes ist ein Laken, auf dem die Merowinger-Königin Adelgunde um 565 n. Chr. in der Kathedrale in St. Denis in Paris bestattet wurde [27]. Zu Beginn des zwölften Jahrhunderts legten die Karthäuser in ihren Regeln den Gebrauch von Hanfkleidung fest [28].

Die zentralasiatischen Nomadenvölker nutzten *Cannabis* auch als Nahrungsmittel. *Cannabis*-Samen wurden überall auf der Welt für Breie und Suppen [29, 30] und z. T. als Grabbeigaben verwendet. Der früheste archäologische Fund von *Cannabis*-Samen in Europa stammt aus einer Grabung bei Eisenberg in Thüringen, einer Gegend, in der noch bis Mitte des 20. Jahrhunderts *Cannabis* angebaut wurde [31]. Von Zentralasien breitete sich der *Cannabis*-Anbau nach Westen aus, und die berauschende Wirkung der Pflanze, die diese vermutlich als Schutz vor Tierfraß entwickelte, fand Eingang in alle Kulturen des Mittleren Ostens, Indiens, Japans, Europas sowie Afrikas und wurde bei religiösen Riten und mystischen Kulte geschätzt [32].

Aufgrund der Rauheit seiner Fasern war *Cannabis* im Mittelalter nicht sehr gefragt. Erst zum ausgehenden Mittelalter änderte sich seine Bedeutung für die europäischen Kulturen, als sich eine Verwendung für die Papierherstellung und in der Hochseeschifffahrt abzeichnete. Die in der Nähe von Xian gefundene Papierprobe aus der Zeit von 140 bis 87 v. Chr. bestand aus Hanffasern und dürfte das älteste Papier der Welt sein [33]. Im 14. Jahrhundert kam die Technik der Papierherstellung aus *Cannabis* von China nach Europa. Nach der Erfindung des Buchdrucks durch Johann Gutenberg im Jahre 1455 nahm dieser Wirtschaftszweig einen enormen Aufschwung. Die Gutenberg-Bibel bestand überwiegend aus *Cannabis*-Fasern. Bis 1883 wurden zwischen 75 und 90 % des weltweit produzierten Papiers aus *Cannabis*-Fasern (und Hadern bzw. Lumpen) hergestellt [34]. Im Rahmen der wachsenden Hochseeschifffahrt ab dem 16. Jahrhundert wurde die Galeere als der bis dahin vorherrschende Schiffstypus durch das Segelschiff abgelöst. Für die gesamte Takelage, die Ankertaue, Verladenetze, Fischernetze, Flaggen erwies sich *Cannabis* mit seiner Reiß- und Nassfestigkeit als konkurrenzlos überlegen.

Den Sprung auf den amerikanischen Kontinent schaffte *Cannabis* durch die spanischen und portugiesischen Seefahrer (im Jahre 1545 nach Chile, im Jahre 1554 nach Peru), später brachten die Engländer ihr europäisches Wissen nach Kanada (1606), Virginia (1611) und Neuengland (1632) mit [35]. Als 1492 Christoph Kolumbus nach Amerika segelte, waren für sein Schiffszubehör achtzig Tonnen *Cannabis* verarbeitet worden. Die vielfältige Nutzung von *Cannabis* verbreitete sich in den USA schnell – die Wagen der Siedler und Goldsucher waren mit gewobenen Planen aus *Cannabis* bedeckt [36]. Der Anbau von *Cannabis* war im 17. und 18. Jahrhundert teilweise sogar gesetzlich verboten worden. So musste z.B. nach

1880 *Cannabis* für die Fabrikation von Schnüren, Seilen und Fäden gepflanzt werden – u. a. auch für Henkersschlingen [37].

Zwischen 1631 und dem frühen 19. Jahrhundert galt *Cannabis* in weiten Teilen Nordamerikas als gesetzliches Zahlungsmittel: Mehr als zweihundert Jahre lang war es überall in Nordamerika möglich, Steuern mit *Cannabis* zu bezahlen [38]. Seine berühmte erste Blue Jeans fertigte Levi Strauss - ein aus Bayern nach San Francisco ausgewanderter Schneider - 1837 aus *Cannabis*-Tuch. Die amerikanische Unabhängigkeitserklärung wurde 1776 auf holländischem *Cannabis*-Papier geschrieben.

Als Therapeutikum wird *Cannabis* 2737 v. Chr. erstmals im "Pen Tsao", dem chinesischen Arzneibuch des Kaisers Shen Nung, erwähnt [39]; er beschrieb über 120 Einsatzmöglichkeiten von *Cannabis* und datiert die Quellen seines Wissens auf ca. 2000 v. Chr. Nach dem ersten Kreuzzug 1095 n. Chr. wurde *Cannabis* in die europäische Volksmedizin eingeführt. Maßgeblich für die medizinische Verwendung von *Cannabis* in Europa waren bis zum Ende des Mittelalters die Ansichten der unumstrittenen Ärzte wie Galen (2. Jahrhundert n. Chr.) und Plinius. Es wurden Geheimrezepturen aus *Cannabis* zur Förderung der Wundheilung, zur Muskelentspannung, zur Fiebersenkung, bei der Geburtshilfe und zahlreichen weiteren Anwendungen verabreicht [40]. Hildegard von Bingen (1098-1179) erwähnt in ihrer *Physika* *Cannabis*-Samen als schmerzlinderndes Mittel. Es ist auch überliefert, dass der Leibarzt der englischen Königin Viktoria I. *Cannabis*-Tinkturen bei Husten, Asthma, Migräne und Menstruationsbeschwerden verordnete, und dass während der Regentschaft der Königin (1837–1901) die Verwendung von Indischem *Cannabis* in der Medizin der englischsprachigen Welt enorm anstieg.

Bis 1937 war *Cannabis* in den USA in Form einer Tinktur legal erhältlich; zwischen 1842 und 1900 machten dort *Cannabis*-Präparate die Hälfte aller verkauften Medikamente aus, und zwischen 1850 und 1937 empfahlen die offiziellen US-amerikanischen Arzneimittelbücher bei über hundert verschiedenen Krankheiten *Cannabis* als wesentliches Heilmittel [41]. Die Reindarstellung von Morphin und Acetylsalicylsäure (Aspirin®) verdrängte zunehmend das bis dahin am häufigsten benutzte Heil- und Schmerzmittel aus *Cannabis*. Die modernen Analgetika waren pflanzlichen *Cannabis*-Produkten durch ihre genaue Dosierbarkeit und definierte Zusammensetzung überlegen, so dass die medizinische Anwendung von *Cannabis* nach und nach in Vergessenheit geriet [42].

Das 19. Jahrhundert führte zu einem abrupten Niedergang des Handels mit *Cannabis*-Fasern. Die aufkommende Dampfschiffahrt verdrängte allmählich die Segelschiffahrt und damit einen bedeutenden Auftraggeber der *Cannabis*-Industrie. Die neue und schnellere Transportmethode verbilligte den Import von Waren aus Übersee. Die Erfindung von Maschinen, die die Verarbeitung von Baumwolle erleichterten, steigerten deren Nachfrage. Da die Verarbeitung von *Cannabis* weiterhin arbeitsintensiv und teuer blieb, sank der Bedarf. Bis in die 30er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurden zwischen 70 und 90 % aller Seile und Schnüre aus *Cannabis* hergestellt, dann verdrängten Baumwollimporte und synthetische Fasern die *Cannabis*-Produkte. Petroleum und Kerosin ersetzten das bereits seit dem 8. Jahrhundert verwendete Hanföl als Leuchtöl [42]. 1845 ermöglichte die Erfindung des Holzschliffs, Papier aus Holzfasern herzustellen und machte Holz zum primären und billigeren Rohstoff [43]. Im Rahmen der Kriegswirtschaft von 1914-1918 und von 1939-1945 wurde der Anbau von *Cannabis* wegen seiner Anspruchslosigkeit und vielfältigen Nutzbarkeit (man stellte auch TNT und Dynamit aus *Cannabis* her) forciert. Obwohl Kunststoffe auf *Cannabis*-Basis gewonnen werden konnten, wie das von Henry Ford 1941 konstruierte "Hanfmobil" (das „Pflanzenauto“, das vom Acker wächst) zeigte, dessen Karosserie, Armaturen und textile Ausstattung aus *Cannabis* gefertigt, und dessen Motor mit *Cannabis*-Dieselöl betrieben werden konnte, wurden die modernen synthetischen Fasern (z. B. Nylon) der aufkeimenden Erdölindustrie effektiver vermarktet.

Der ökonomische Niedergang von *Cannabis* erfolgte wohl aus wirtschaftlichen Motiven, da sowohl Baumwollfarmerverbände als auch Tabak-, Holz-, Papier-, Arzneimittel-, Erdöl- und Alkoholproduzenten um ihre Marktanteile fürchteten [44].

1.1.2 *Cannabis* als Rohstoff für Rauschmittel

In seinen asiatischen Anbauländern wurde *Cannabis* als Opiumersatz verwendet und in den USA häufig als Narkotikum verschrieben. In Europa symbolisierte *Cannabis* lange Zeit das Armsein – *Cannabis* rauchte, wer sich Tabak nicht leisten konnte. *Cannabis* verschaffte durch seine berauschende Wirkung Zugang zu neuartigen Erfahrungsbereichen und phantastischen Wahrnehmungsmöglichkeiten, die die künstlerische Produktivität anregten [45]. In

Deutschland hatte *Cannabis* als Alltagsdroge nie eine vergleichbare Stellung wie z. B. in asiatischen Ländern oder in Afrika. So wurde in der ersten von 1872 geltenden Regelung „über den Verkehr von Apothekerwaren“ lediglich bestimmt, dass bestimmte „Drogen und chemische Präparate“ nur in Apotheken verkauft werden dürfen, darunter auch „Indischer Hanf – Herba *Cannabis Indicae*“. 1924 erließ die zweite internationale Opiumkonferenz in Genf ein weltweites Gesetz zur Drogenkontrolle und stufte Haschisch als Betäubungsmittel ein [46]. Erst 1929 wurden auch in Deutschland Handel und Konsum von "indischem Hanf und seinem Harz" verboten [47]. In der Nachkriegszeit endete allmählich die Forschung über *Cannabis* und dessen medizinische Verwendung. Erst durch die internationale Flower-Power-Bewegung wurde *Cannabis* wieder in Deutschland bekannt, vor allem in den 68er-Studentendemonstrationen. 1972 trat in Deutschland eine Änderung des Gesetzes über den Verkehr mit Betäubungsmitteln in Kraft, wodurch das vollständige Verbot von *Cannabis* und einigen anderen Drogen geregelt wurde [48].

Cannabis ist neben Alkohol und Nikotin das am dritthäufigsten konsumierte Rauschmittel. Nach den wissenschaftlichen Ergebnissen der letzten zweihundert Jahre ist *Cannabis* eine zwar nicht ungefährliche, aber doch eine der am wenigsten schädlichen Drogen [49]. Trotz größter politischer, finanzieller, polizeilicher und militärischer Anstrengungen ist es bis heute keinem einzigen Staat der Erde gelungen, einen bestehenden illegalen *Cannabis*-Markt zu beseitigen [50]. *Cannabis* ist die in Deutschland am häufigsten gebrauchte und gehandelte illegale Droge [51] von mindestens zwei Millionen Konsumenten. Die Zahl der *Cannabis*-bezogenen Strafprozesse hat sich in Deutschland von 1992 bis 2010 um das 2,7-fache erhöht auf 128868 eingeleitete Ermittlungsverfahren [52]. Die Erstkonsumenten (Einstiegsalter bei „Kiffen“ 16,4 Jahre) werden immer jünger [53, 54, 55]. Das Saatgut der *Cannabis*-Pflanze wurde sowohl durch konventionelle Zucht als auch gentechnisch verändert, um die psychodelische Wirkung zu erhöhen. Jeder zehnte *Cannabis*-Raucher wird heute abhängig.

Marihuana ist getrocknet lange haltbar und deshalb wirtschaftlich attraktiv. Haschisch, das zu Platten oder Blöcken gepresste Harz der weiblichen *Cannabis*-Pflanze, gibt es in den verschiedensten Sorten, Farben und Konsistenzen, die eine Folge unterschiedlicher *Cannabis*-Sorten als auch Herstellungsverfahren (mit diversen Streckmitteln) sind. So kommt beispielsweise „Schwarzer Afghane“ (schwarzes Haschisch) hauptsächlich aus Afghanistan, „Roter Libanese“ aus dem Libanon und „Grüner Türke“ aus der Türkei und Marokko [56, 57].

Haschischöl ist ein THC-haltiges Konzentrat aus dem Harz der weiblichen *Cannabis*-Blütenstände. Reinheitsproben des Bundeskriminalamtes ergaben THC-Gehalte von 5-41%, so dass Haschischöl als das potenteste aller *Cannabis*-Produkte gilt [58].

1.2 Botanik

1.2.1 Herkunft

Die robuste *Cannabis*-Pflanze stammt vermutlich aus dem Himalaya-Gebiet, wo sie auch heute noch wild wächst. Da die holzige Staude leicht aus der Kultur verwildert, lässt sich ihre ursprüngliche Heimat nicht mehr mit Sicherheit feststellen [59]. Über Indien [60] gelangte sie in den Mittleren und Nahen Osten nach Europa, Afrika und schließlich nach Nord- und Südamerika [61]. Mit Ausnahme von Wüsten, Tropen und Polargebieten gedeiht sie überall.

1.2.2 Anbau

„Würde *Cannabis* legal und mit den technischen Hilfsmitteln des 20. Jahrhunderts angebaut und verarbeitet, wäre er heute der ertragreichste Rohstoff der Erde“ [62]. Viel überliefertes Wissen über den *Cannabis*-Anbau ist durch das *Cannabis*-Verbot verloren gegangen. Ein Aufsatz aus dem Jahr 1986, der der Frage nachgeht, ob *Cannabis* eine agrarpolitische Wende darstellen könnte, bezieht sich ausschließlich auf Literatur von 1920 bis 1940 [63].

Cannabis ist schon lange eine kultivierte Pflanze der gemäßigten Breiten und deshalb für die Boden- und Klimaverhältnisse in Deutschland geeignet. Die Pflanze gilt als bodenschonend, kommt infolge ihrer Schädlingsresistenz größtenteils ohne Herbizide aus und ist daher für den integrierten Pflanzenschutz und biologischen Anbau sehr gut einsetzbar [64]. Die Hauptwachstumsphase ist in Deutschland zwischen Juni und Juli. *Cannabis* nutzt die Sonnenenergie effektiver als viele andere Pflanzen und wächst in hundert Tagen bis zu vier Meter hoch, verbessert dabei den Boden und bedarf nur minimaler Düngergaben. *Cannabis*

vermag der erhöhten ultravioletten Strahlung nicht nur zu widerstehen, sondern gedeiht unter ihrem Einfluss sogar außerordentlich gut [65].

Der heutige Weltanbau von Nutzhanf verteilt sich auf folgende Kontinente: Asien 58,8 % (v. a. China und Indien), die ehemalige UdSSR 20,8 %, Europa 19,4 % und Südamerika (v. a. Chile) 1,4 % [66].

Der Anbau von Nutzhanf in der Europäischen Union (EU) seit 1993 erlebte 1998 einen Höhepunkt (vgl. Abb. 1). Anfang der 90er Jahre erfolgte dieser praktisch ausschließlich in Frankreich (für die Produktion von Spezialzellstoff), nach der Zulassung in weiteren Ländern haben sich die Anbauflächen in der EU fast verdreifacht und lagen 2004 bei 16.000 ha – bei gleichzeitig sinkenden EU-Beihilfen für den Anbau bzw. die Verarbeitung von Nutzhanf [67].

In der EU sind 41 industrielle *Cannabis*-Sorten im Jahr 2009 zugelassen worden. Neben der Anbaueignung ist ein THC-Gehalt von weniger als 0,2 % für die Sortenzulassung zwingend vorgeschrieben. Nur zertifiziertes Saatgut darf verwendet werden [68].

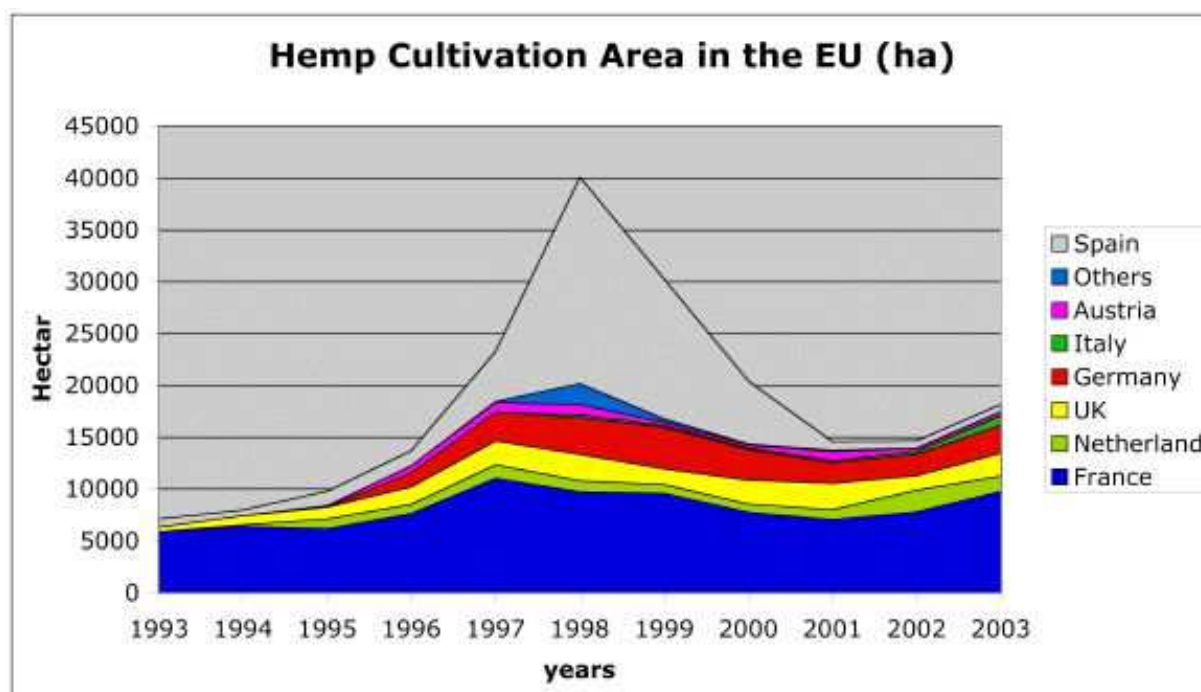


Abb. 1: Anbauflächen von Faserhanf in der EU zwischen 1993 und 2004 [67]

1.2.3 Morphologie der *Cannabis*-Pflanze

Die folgenden botanischen Informationen zur *Cannabis*-Pflanze sind – soweit nicht anders vermerkt – der Diplomarbeit von REUTER [69] entnommen. *Cannabis* bildet zusammen mit dem Hopfen (*Humulus*) die Familie der *Cannabaceae* (Hanfgewächse), die zur Ordnung der *Urticales* (Brennesselartige) gehört [70, 71].

Die ursprünglich getrenntgeschlechtliche *Cannabis*-Pflanze bildet nur männliche oder nur weibliche Blüten, sie ist also zweihäusig (diözisch). Von Natur aus besteht der diploide Chromosomensatz aus $2n = 20$ Chromosomen, wobei der schwächer entwickelte männliche Femelhanf heterogametisch (XY) und die dichter belaubte weibliche Hanfhenne homogametisch (XX) ist. Es treten recht häufig monözische Typen auf [72]. *Cannabis* ist einjährig und windblütig. Der Pollen kann über 12 km weit getragen werden [73]. Die Wuchshöhe kann im Bestand bis 4 m erreichen (im Extrem 6–7 m [74]) und je nach Standort mehr oder weniger verzweigt sein. Es werden südliche Rassen (hohe und spätreife Kurztagformen) und nördliche Rassen (niedrige und frühreife Langtagformen) unterschieden [75, 76]. Die kräftige Pfahlwurzel kann sich stark verästeln und den Boden gegen Erosion schützen.

Die langgestielten, tiefgefügten Blätter mit dunkelgrüner Ober- und blassgrüner Unterseite setzen sich aus 1-11, meistens 5–9 gezähnten, schmal lanzettlichen Blattfingern zusammen (Abb. 2) [77]. Auf der gesamten Oberfläche der Pflanze befinden sich - außer auf Samen und Wurzeln - Drüsenhaare. Sie produzieren ein klebriges Harz, das zu 80-90 % Cannabinoide enthält [78, 79]. *Cannabis*-Samen und -Fasern sind frei von Cannabinoiden.

Der dichteste Besatz und die größten Drüsen befinden sich an den unscheinbaren weiblichen Blütenständen, hier besonders auf den Samenhüllblättern (vgl. Abb. 2: Legende 7). Die weiblichen Pflanzen sind hinsichtlich ihrer verschiedenen Nutzungsmöglichkeiten wichtiger als die männlichen: Hanfhennen bilden nährstoffreiche Samen, stärkere Fasern und mehr Cannabinoide. Der Cannabinoidanteil korreliert mit der Menge der Drüsenhaare [78, 80]. Aus botanischer Sicht handelt es sich beim *Cannabis*-Samen um eine einsamige, rundliche, gestielte Nuss (Achäne). Die nährstoffreichen Samen sind braun bis grauschwarz, manchmal auch graugrün gefärbt. Sie werden 2-6 mm lang, 2-4 mm breit, und haben ein Tausendkorngewicht von 15-20 g [81].

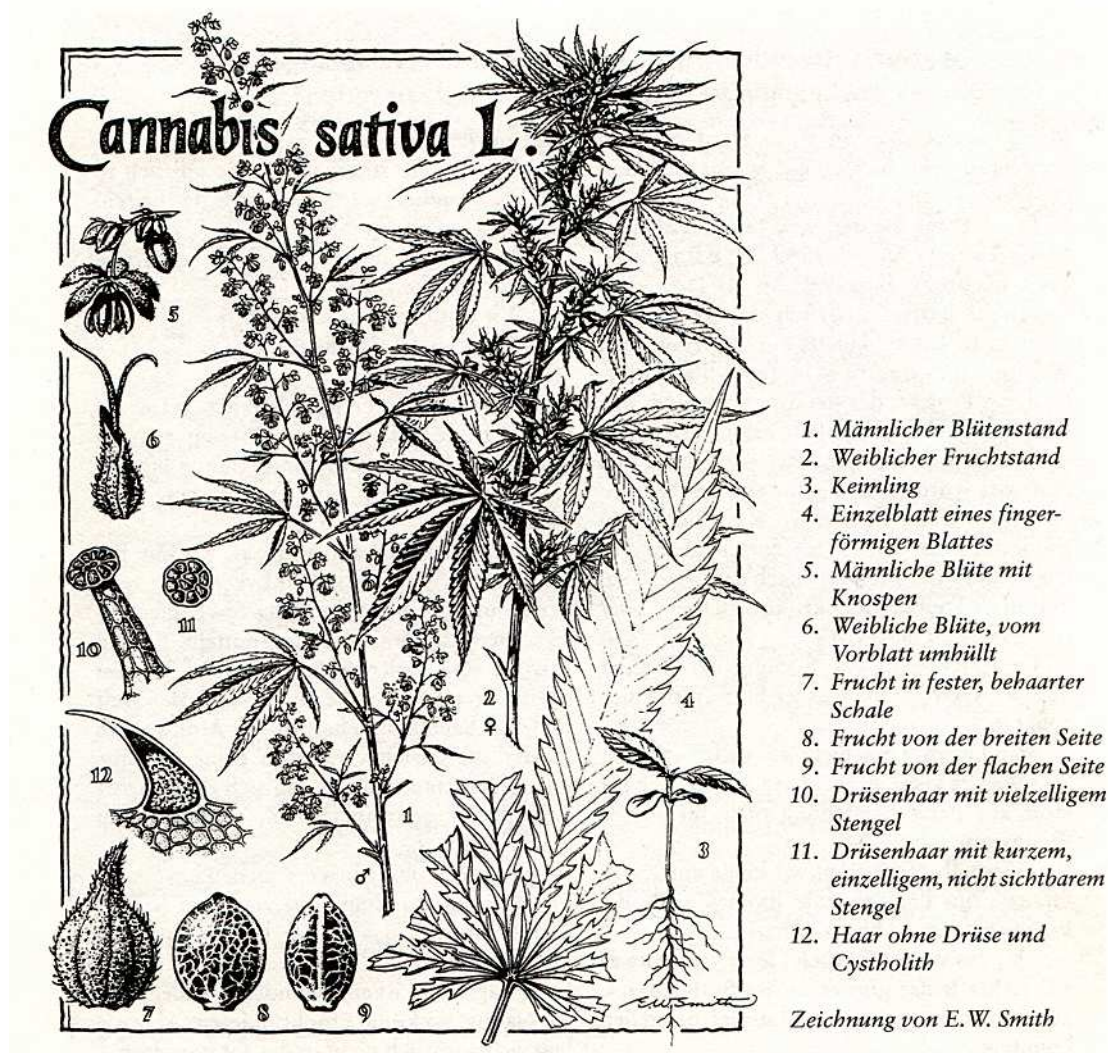


Abb. 2: Zeichnung von E.W. Smith zur Morphologie der *Cannabis*-Pflanze [82]

Cannabis stellt eine in Kultur genommene Wildpflanze dar, deren Veränderungen sich klima- und züchtungsbedingt in der Qualität der Fasern, des Öls und des Harzes unterscheiden. Die vielen Varietäten lassen sich aufgrund geringer morphologischer Unterschiede (wie z. B. Wuchshöhe, Wuchsform, Blattstellung) in drei Unterarten einteilen: *C. sativa* (nützlicher Gewöhnlicher Hanf), *C. indica* (harzreicher Indischer Hanf) und *C. ruderalis* (Wilder Hanf) [83]. Botaniker sind jedoch übereinstimmend der Ansicht, dass es sich bei *Cannabis* nur um eine Spezies handelt, deren Sorten untereinander kreuzbar sind und die fertile Hybriden hervorbringen [84].

1.2.4 Inhaltsstoffe der *Cannabis*-Pflanze

1.2.4.1 Pharmakologische Inhaltsstoffe und deren Wirkung bzw. Anwendung

Cannabis enthält eine große Anzahl unterschiedlicher Inhaltsstoffe, von denen bisher über 420 charakterisiert wurden [85]. Dazu gehören beispielsweise Carotinoide, Chlorophylle, Xanthophylle [86], Eugenol, Gujacol, Piperidine [87] und Trigonelline [88]. Die bedeutendsten pharmakologisch wirksamen Substanzen der *Cannabis*-Pflanze sind die Cannabinoide. Es handelt sich dabei um organische Verbindungen mit 21 Kohlenstoffatomen, von denen heute mehr als 60 bekannt sind [89, 90] und die sich in ihrem Wirkungsprofil unterscheiden [91].

Cannabinoide gelten als immunsuppressive Substanzen seit JUEL-JENSEN 1972 erstmals über ein gehäuftes Wiederauftreten von *Herpes-simplex*-Effloreszenzen bei Marihuana-Rauchern berichtete [92]. Danach wurde eine Vielzahl von Effekten auf fast alle Zellarten des Immunsystems nachgewiesen [93, 94, 95, 96, 97]. Cannabinoide scheinen aber nur in vitro in hohen – oberhalb pharmakologischer Blutspiegel liegenden – Konzentrationen eine signifikante Immunsuppression zu verursachen [98].

Die Wirkung von exogenen Cannabinoiden (vgl. Tab. 1) kommt über körpereigene Cannabinoid-Rezeptoren (CB-Rezeptoren, CBR) zustande. Die Rezeptoren des Endocannabinoid-Systems gehören zur Gruppe der 7-Helix-Transmembranproteine, die über G-Proteine an intrazelluläre Effektorsysteme gekoppelt sind (GPCRs). CB₁-Rezeptoren sind vorwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert und finden sich hauptsächlich in Hirnregionen, die im motorischen System [99], im Belohnungssystem und bei Lernprozessen eine Rolle spielen [100]. CB₁-Rezeptoren werden vor allem in der präsynaptischen Membran der Neurone exprimiert und regulieren über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Transmitterausschüttung GABAerger, glutamaterger und dopaminerger Synapsen. Die wichtigsten Endocannabinoide, also endogene Liganden, sind die Arachidonsäurederivate Arachidonylethanolamid (AEA, Anandamid) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) (Tab. 1). Die zelluläre Aktivität des postsynaptischen Neurons fördert die kontinuierliche Synthese und Freisetzung der Endocannabinoide aus Phospholipiden der Zellmembran, die dann an die CB₁-Rezeptoren in der präsynaptischen Membran binden. Die Stimulation der an inhibitorische G-Proteine gekoppelten CB₁-Rezeptoren führt über die Aktivierung von

Kaliumströmen sowie über die Inhibition von spannungsabhängigen Calciumkanälen und der Adenylatcyclase zu einer Hemmung der Aktivität des präsynaptischen Neurons. Eine verminderte Transmitterausschüttung in der Präsynapse sowie eine verminderte zelluläre Erregbarkeit sind die Folge [101].

CB₂-Rezeptoren werden in diversen Zellen des Immunsystems, vor allem von B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Monozyten exprimiert. Hauptsächlich über eine Hemmung der Adenylatzyklase und die anschließende Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration werden immunsuppressive Mechanismen wie die Induktion von Apoptose, die Hemmung von Zellproliferation und Zytokinproduktion vermittelt sowie regulatorische T-Lymphozyten induziert [102].

Tab. 1: Exogene und endogene Cannabinoide [103]

Phytocannabinoide	Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) Cannabidiol (CBD)
Synthetische Cannabinoide	Synthetisches Dronabinol® THC-Analogon Nabilon® (Cesamet®)
Endogene Cannabinoide	Arachidonylethanolamid (AEA, Anandamid) 2-Arachidonoylglycerol (2-AG)

Quantitativ und qualitativ wichtigster halluzinogener und medizinisch relevanter Inhaltsstoff ist das THC, das ausschließlich in *Cannabis* vorkommt und dessen Gehalt je nach Pflanzensorte stark schwankt. Abhängig vom THC-Gehalt kann zwischen Drogenhanf und Faserhanf unterschieden werden [104, 105, 106, 107]. Bei den Abweichungen im Harz- und Fasergehalt ist es unklar, ob sie auf genetischen Varietäten oder auf Umwelteinflüssen beruhen [108]. THC wurde erstmals 1964 von GAONI und MECHOULAM isoliert [109]. Besonders reich an THC (6–20 %) sind die unbefruchteten weiblichen Blütenstände sowie die blütennahen Blätter (5–6 %). Die übrigen Pflanzenteile und die männlichen Pflanzen enthalten weniger als 1 % THC [110]. Im Inneren der Samen werden nur sehr geringe THC-Mengen aufgefunden (weniger als 2 mg/kg bei Drogenhanf und weniger als 0,5 mg/kg bei Faserhanf [111]). Die THC-Höchstwerte für Faserhanf (gemessen im oberen Pflanzendrittel) wurden in der EU stufenweise von 0,5 % (1984) auf 0,2 % (seit 2002) abgesenkt [112]. In der Schweiz dürfen alle *Cannabis*-Pflanzentypen legal angebaut werden und Varietäten mit hohem THC-Gehalt sind üblich, allerdings wurden THC-Grenzwerte für Nahrungsmittel aus *Cannabis* festgelegt [113].

THC liegt in der *Cannabis*-Pflanze als physiologisch inaktive THC-Carboxysäure vor, die durch Alterung, Austrocknung, UV-Strahlen, Hitze und beim Rauchen zu THC decarboxyliert [114]. Cannabidiol (CBD, $C_{21}H_{30}O_2$) ist das mengenmäßig zweitwichtigste Cannabinoid in natürlichen *Cannabis*-Produkten und der biologische Vorläufer des THC. Die Strukturformeln von THC und CBD zeigt Abbildung 3.

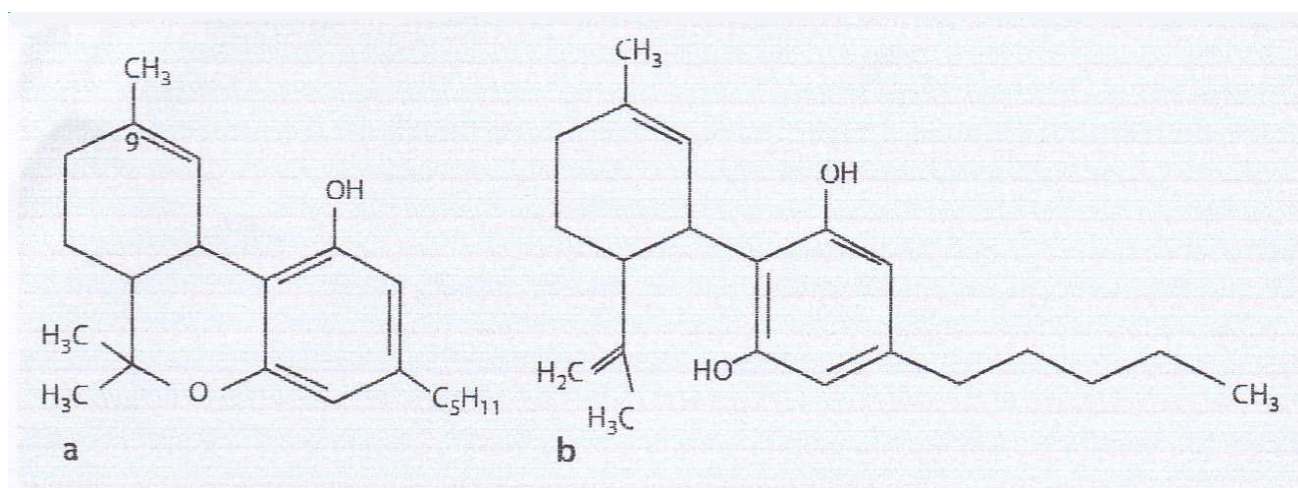


Abb. 3: Strukturformeln von (a) Delta-9-Tetrahydrocannabinol und (b) Cannabidiol [103]

Neben den psychotropen Effekten wird THC eine analgetische [115, 116], muskelrelaxierende, antiemetische [117, 118, 119, 120, 121, 122, 123] und appetitstimulierende Wirkung zugeschrieben [124]. THC entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über eine Bindung an CB_1 -Rezeptoren [125].

Es ergaben sich zunehmend Hinweise, dass die unerwünschten psychotropen Effekte einer Therapie mit synthetischem THC (Dronabinol, Marinol®) wie Intoxikation, Sedierung, Gedächtnisstörungen und Dysphorie bei der Applikation von Pflanzenextrakten aus *Cannabis sativa*, die neben THC eine Vielzahl anderer Cannabinoide enthalten, abgemildert sind [126]. Diese Modulierung der THC-Wirkung wird im Wesentlichen auf CBD zurückgeführt, das zum einen die Umwandlung von THC in seinen besonders aktiven Metaboliten 11-Hydroxy-THC (11-OH-THC) hemmt. Zum anderen wirkt CBD aber auch synergistisch mit THC, wodurch die Resorption von THC verzögert und somit Spitzenserumkonzentrationen, die mit dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen assoziiert sind, vermieden werden [127]. Die aus (natürlichen und künstlichen) Cannabinoiden hergestellten Medikamente, die legal verfügbar sind, stellt Tabelle 2 zusammen.

Tab. 2: Pharmazeutische Produkte mit Cannabinoid-Rezeptor-vermittelter Wirkung [103]

Produkt	Inhalt bzw. Wirkstoff	Applikation	Indikationen
Sativex®	Pflanzenextrakt, THC und CBD im Verhältnis 1:1	Oromukosales Spray	Spastik bei Multipler Sklerose
Marinol®	Synthetisches Dronabinol [(-)-trans-Isomer von THC]	Oral	Anorexie und Gewichtsverlust bei AIDS, chemotherapieinduzierte, therapieresistente Übelkeit und Erbrechen (in den USA)
Cesamet®	Nabilon (synthetisches Derivat von THC)	Oral	chemotherapieinduzierte, therapieresistente Übelkeit (in Großbritannien)

Hinweise auf deutliche Lokaleffekte infolge *Cannabis*-Gebrauchs liefern neuere Studien von Hii [128]. Sie berichten über atypische Lungenerkrankungen bei regelmäßigen Marihuana-Rauchern. Da diese ihren Atem viermal länger anhalten, vergrößert sich ihr Lungenvolumen um bis zu 70 % [129], was nach histopathologischen Untersuchungen zu Entzündungen der Atemwege führen kann [130, 131, 132]. Auch eine alveolare Makrophagendysfunktion [133, 134], die Unterdrückung des Immunsystems [135], unregelmäßiges Wachstum des bronchialen Epithels [136], Tuberkulose nach gemeinsamer Benutzung einer Wasserpfeife [137], Histoplasmose [138], Fibrose [139] und ein nekrotisierendes Lungengranulom [140] wurden beispielsweise beobachtet.

Die häufigste Applikationsform von *Cannabis* ist inhalativ, indem eine *Cannabis*-Zigarette (Joint) geraucht wird. Die Bioverfügbarkeit (Anteil des im Körper aktiven THC) ist bei Inhalation stark abhängig von Verlusten durch die Pyrolyse [141] sowie von der Rauchtechnik [142, 143] und schwankt zwischen 10 und 50 % [144]. THC wird vom Körper rasch und nahezu vollständig resorbiert und ist bereits wenige Minuten nach Inhalation im Blutplasma nachweisbar [415]. Erste psychische Effekte sind schon nach Sekunden spürbar. THC wird rasch in gut durchblutetes Gewebe, beispielsweise ins Gehirn, weitergeleitet, erreicht über den Blutkreislauf proteingebunden fast alle Körperregionen und reichert sich aufgrund seiner hohen Lipidlöslichkeit im Körperfett verzögert an [146, 147]. Die Halbwertszeit von THC im Körper ist individuell sehr verschieden und beträgt im Mittel ca. 7 Tage [148]. Die relativ langsame Ausscheidung aus dem Körper (ca. 30 % renal, bis 65 % fäkal) [149, 150] beeinträchtigt die Konzentration beim Autofahren und Bedienen von

Maschinen; zusätzlich besteht eine signifikante Wechselwirkung zwischen THC und Alkohol [151].

Nach oraler Anwendung wird THC im Körper viel langsamer aufgenommen und zeigt wegen des Abbaus in der Leber eine wesentlich geringere Bioverfügbarkeit: Nur 10–20 % des oral aufgenommenen THC erreicht die Blutzirkulation [152]. Die Wirkung tritt nach oraler Aufnahme verzögert nach 30–60 Minuten ein; das Wirkmaximum wird nach 2–4 Stunden erreicht [153]. Aufgrund seiner hohen Lipophilie wird THC nur sehr langsam aus dem Fettgewebe entfernt [154].

1.2.4.2 Ernährungsphysiologisch bedeutsame Bestandteile und deren Metabolisierung

Seit 1996 die betäubungsmittelrechtlichen Vorschriften den Anbau von Faserhanf in Deutschland (nach langjährigem Verbot) wieder gestatten [155], finden verschiedene Bestandteile der *Cannabis*-Pflanze (Blüten, Samen, fettes und ätherisches Öl, Keimlinge, Blätter) zur Herstellung von Nahrungsmitteln und Kosmetika Verwendung. Die ständig anwachsende Produktpalette umfasst beispielsweise „Hanfsamen, Hanfschrot, Hanfmehl und Hanfsamenöl“ sowie Back- und Teigwaren (Nudeln, Brot), Süßwaren (Müsli, Müsli-Riegel, Biskuits, Pastillen, Gummibärchen, Schokolade, Schokoaufstrich, "Hanfeis mit dem neuen Nussgeschmack"), Wursterzeugnisse, Kräutertees, Limonaden (Sirup), Biere und Schnäpse. Auch Haut- und Haarpflegemittel werden unter Mitverwendung von *Cannabis* hergestellt [156].

Dabei gilt der Grundsatz, dass Lebensmittel wie auch Kosmetika keine bedeutsame pharmakologische Wirkung haben dürfen. Bei der Ernte können geringfügige Mengen THC, die z.B. vom Staub der Samenhüllblätter stammen, in die Lebensmittel gelangen [157]. Für die Verwendung in Nahrungsmitteln muss sichergestellt sein, dass die THC-Gehalte der Samen weder durch Kontaminationen mit THC-reichen Pflanzenteilen noch durch entsprechende Anbaubedingungen erhöht werden [158]. In der Praxis liegen die THC-Gehalte von „Hanf-Lebensmitteln“ so niedrig, dass psychotrope Effekte selbst beim Konsum größerer Mengen sicher ausgeschlossen werden können [159, 160]. Seit 2000 existieren in Deutschland erstmalig offizielle Richtwerte für den THC-Restgehalt in Nahrungsmitteln, die von den

führenden deutschen Lebensmittel-Überwachungsinstituten "Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)" - heute „Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)“- und "Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM)" verabschiedet wurden (vgl. Tab. 3).

Tab. 3: THC-Grenzwerte in Nahrungsmitteln [BgVV/SKLM vom 16.03.2000]

Nahrungsmittel	mg THC/kg
Alkoholische Getränke	0,005
Nichtalkoholische Getränke	0,005
Speiseöle	5
alle anderen Nahrungsmittel	0,15

Cannabis-Samen gehören zu den ernährungsphysiologisch hochwertigen Ölfrüchten (Ölgehalt bis zu 35 %) [161]. Sie werden traditionell als Vogel- oder Fischfutter verkauft. Das beim Pressen anfallende nussartig schmeckende „Hanföl“ enthält den höchsten Anteil mehrfach ungesättigter essenzieller Fettsäuren aller Pflanzenöle (ca. 75 %) [162, 163]. Mit einem Gehalt von 40-60 % Linolsäure $C_{17}H_{31}COOH$ und 14-28 % Linolensäure $C_{17}H_{29}COOH$ [164] ist es damit eines der wertvollsten Speiseöle überhaupt [165, 166]. Problematisch ist die Anfälligkeit der hoch ungesättigten Fettsäuren gegen Oxidation, besonders bei Exposition gegenüber Licht oder Hitze [113]. Daher weist kaltgepresstes Hanföl eine relativ kurze Haltbarkeit auf. Durch Züchtung von Samen mit erhöhtem Tocopherol-(Vitamin E-)Gehalt als Oxidationsschutz versucht man die Vermarktung des Öls zu erleichtern [167].

Die Proteine der *Cannabis*-Samen sind leichtverdaulich [168] und enthalten alle acht essenziellen Aminosäuren in einem für die menschliche Ernährung optimalen Spektrum [169]. Der Gehalt an der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin, die z.B. bei der Bildung von Federn eine zentrale Rolle spielt, ist bei *Cannabis*-Samen vergleichsweise hoch, weshalb diese von Vögeln beim Futter bevorzugt werden [170].

Der bei der Ölgewinnung anfallende Pressrückstand ist der sog. „Hanfkuchen“, ein hochwertiges Viehfutter, das aus 23,9 % Protein, 10,3 % Kohlenhydraten sowie 4,3 % Fett besteht [171] und evtl. zu cholesterin- und glutenfreien Nahrungsmitteln weiterverarbeitet werden könnte.

„Hanföl“ ist auch für den Einsatz als technisches Öl (Ölfarben, Schmiermittel, Treibstoff, Heizöl) und Wachs geeignet [172].

1.2.4.3 *Cannabis*-Fasern und ihre heutige Verwendung

Alle Teile der *Cannabis*-Pflanze sind restlos verwertbar (Abb. 4); über den Einsatz von *Cannabis*-Kraut bzw. –Samen als Rausch- bzw. Nahrungsmittel wurde in den Abschnitten 1.2.4.1 und 1.2.4.2 berichtet. Aus *Cannabis*-Fasern lassen sich zahlreiche und vielfältige Gebrauchsgüter herstellen wie Kleidung, Papier, Bau- und Brennstoffe, die biologisch abbaubar sind. *Cannabis* produziert in kurzer Zeit die größte Biomasse (10 Tonnen pro Hektar [173]), ist dabei genügsam und eignet sich gut als Pionierpflanze für Ödland [174]. Mit *Cannabis*-Anbau lassen sich z.B. bei gleicher Fläche dreimal soviel Fasern wie von einem Baumwollfeld und viermal soviel Papier wie von einer Holzplantage erzeugen; für jede Tonne Papier, die aus der einjährigen *Cannabis*-Pflanze hergestellt wird, können zwölf ausgewachsene Bäume stehen bleiben [175]. Die ligninarmen *Cannabis*-Fasern lassen sich umweltschonend zu haltbarerem Papier verarbeiten als Holz [176]. „Hanfpapier“ ist kräftiger und bricht beim Falten weniger leicht als Holzschliffpapier [177]. Auf „Hanfleinwand“ gemalte Ölbilder blieben über Jahrhunderte in gutem Zustand archiviert [178]. Wegen der längeren und besseren Faserqualität des Bastes weist „Hanfpapier“ eine hohe zeitliche Beständigkeit auf [179, 180] und kann doppelt so oft recycelt werden wie Holzpapier. *Cannabis* liefert strapazierfähige Naturfasern, die dreimal so reißfest wie Baumwolle sind und keine schädlichen Rückstände enthalten, da sowohl Anbau, Ernte als auch Verarbeitung umweltschonend ablaufen: Kleidung, Stoffe, Matratzen, Bettwäsche, Rucksäcke, Taschen, Geldbörsen, Etais und Gürtel aus *Cannabis* erfreuen sich steigender Nachfrage im Handel.

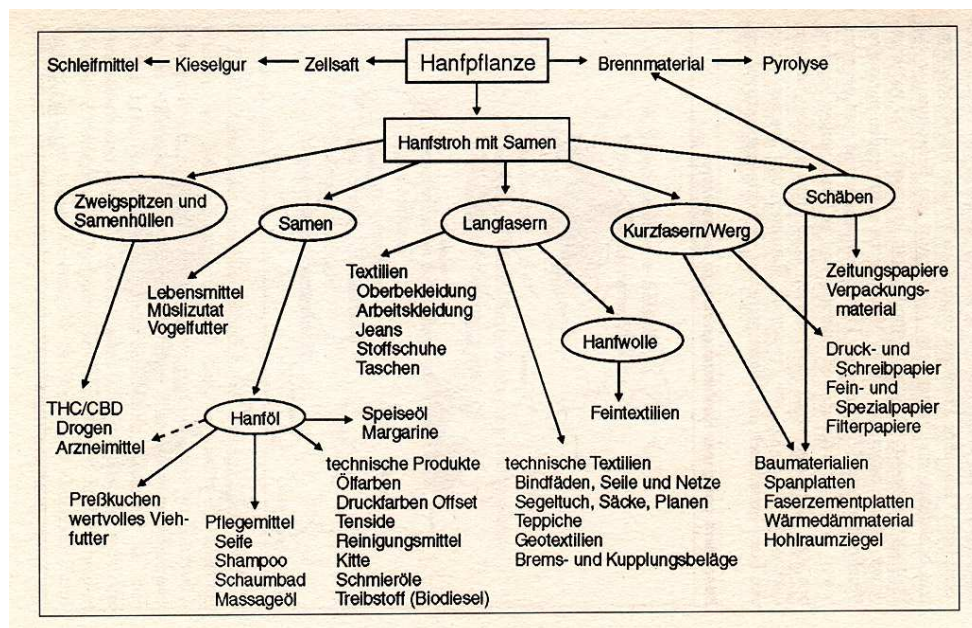


Abb. 4: Nutzungsdiagramm von *Cannabis* [181]

Einsatzfelder von *Cannabis*-Fasern ergeben sich auch im Bereich technischer Anwendungsgebiete und im Bauwesen. „Thermohanf“, ein Isoliermaterial für Wärmedämmung und Schallschutz, normalisiert aufgrund seiner ausgezeichneten Diffusionseigenschaften die Feuchtigkeit und optimiert das Raumklima. Innovativ ist auch „Stopfhanf“, ein feuchteregulierender Fugenfüller für kleine Hohlräume (zwischen Wänden, Balken, Türen oder Fenstern). „Hanffilze“ wirken klimatisierend, indem sie Feuchtigkeit aus der Umgebungsluft aufnehmen und bei trockener Luft wieder abgeben. Ein Prototyp ist „Hanfparkett“ aus Schäben - aus den verholzten Kernen der Hanfstängel (Fa. Thermohanf).

1.3 Allergische Reaktion vom Soforttyp I

Der Begriff Allergie (griechisch: allos „anders“ und ergon „Werk“) wurde von PIRQUET 1906 eingeführt [182], der dabei eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus beschreibt. RING [183] versteht unter Allergie „eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“. Sie entsteht im Organismus nach Kontakt mit Allergie induzierenden Stoffen, den Allergenen. Diese sind zu unterscheiden von einem Allergenträger, z.B. einem Pollenkorn, aus dem verschiedene Allergene freigesetzt werden können.

Allergien lassen sich anhand ihrer Pathomechanismen nach COOMBS und GELL [184] in vier Reaktionstypen einteilen. Es soll an dieser Stelle nur die humorale Immunantwort, die der Soforttypreaktion (Typ-I-Reaktion) zugrunde liegt, in einer für die vorliegende Arbeit relevanten Weise dargestellt werden [185, 186]. Stoffe, die spezifische Immunreaktionen auslösen, werden als Antigene bezeichnet. Voraussetzung für eine Immunantwort ist, dass das Antigen vom Organismus als fremd erkannt wird.

Der Ablauf einer allergischen Reaktion vom Soforttyp lässt sich in zwei Phasen einteilen: Zunächst kommt es in einer Sensibilisierungsphase durch Allergenerstkontakt zur Initiierung der Produktion entsprechender Antikörper. Nach dieser ersten Phase ist der Betroffene sensibilisiert, aber nicht unbedingt erkrankt. In der folgenden Manifestationsphase kann beim Sensibilisierten durch erneute Allergenexposition eine klinische Symptomatik ausgelöst werden.

Die Sensibilisierung beginnt mit der enzymatischen Prozessierung der Allergene durch Antigen präsentierende Zellen (APZ), wie z.B. dendritische Zellen oder Makrophagen. Die Präsentation der körperfremden Antigen(peptid)e erfolgt auf MHC-II-Komplexen auf der Oberfläche der APZ. Werden die offerierten Antigenfragmente von T-Lymphozyten (über komplementäre T-Zell-Rezeptoren, TCR) erkannt, kommt es zur Freisetzung von Signalstoffen (Zytokinen, z.B. Interferone, Interleukine). Diese stimulieren B-Lymphozyten, die das entsprechende Antigen(fragment) bereits gebunden haben und dadurch sensibilisiert worden sind, zur Differenzierung in Plasmazellen und Gedächtniszellen. Die Plasmazellen teilen sich und produzieren antigenspezifische IgE-Antikörper über Monate. Das IgE, das an der allergischen Soforttyp-Reaktion beteiligt ist, findet sich bei gesunden Personen in

vergleichsweise geringen Konzentrationen im Serum (Anteil am Gesamtglobulin normalerweise 0,002 %). Patienten mit atopischen Erkrankungen zeichnen sich dagegen oft durch erhöhte IgE-Spiegel in ihren Blutseren aus.

IgE-Antikörper sind in der Zirkulation anzutreffen und heften sich über einen langen Zeitraum an die hochaffinen Rezeptoren von Mastzellen und basophilen Leukozyten (10^4 - 10^5 Rezeptoren je Zelle) [187]. Zirkulierende IgE-Antikörper und zellgebundene IgE-Antikörper befinden sich im Gleichgewicht. Die spezifischen IgE-Antikörper verbinden sich durch „Erkennung“ der spezifischen komplementären Epitope mit dem Allergen zu Antigen-Antikörper-Komplexen, die von Makrophagen phagozytiert werden. Spezielle T-Lymphozyten, die regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}), früher auch als T-Supressorzellen bezeichnet, hemmen die Immunantwort in verschiedenen Phasen und verhindern überschießende (autoaggressive) Immunreaktionen.

Wenn nach der Sensibilisierung ein erneuter Kontakt mit dem Allergen stattfindet und es zur Brückenbildung zwischen benachbarten rezeptorgebundenen spezifischen IgE-Antikörpern auf der Oberfläche von Mastzellen oder Basophilen kommt, erfolgt die Zellaktivierung. Es kommt zum Einstrom von Calciumionen, die Zelle degranuliert und schüttet präformierte Mediatoren (z.B. Histamin) durch Exozytose aus. Weiterhin werden Mediatoren neu gebildet, wie z.B. Prostaglandine oder Leukotriene. Histamin erweitert kleine Blutgefäße [188]. In der Folge kommt es zur typischen lokalen Rötung mit Wärmeentwicklung und vermehrter Flüssigkeitsansammlung im Gewebe (Ödembildung). Klinisch äußert sich die Reaktion in Symptomen wie Niesen, Fließschnupfen (allergische Rhinitis), Rötung und Tränen der Augen (allergische Konjunktivitis) oder Kontraktion glatter Muskeln, was zu Atembeschwerden oder schwerem, oft tödlichem Asthma (Asthma bronchiale) führt [189, 190]. Die unterschiedlichen Schweregrade variieren von der Urticaria bis zum Herz-Kreislauf-Atemstillstand.

Die schwerste Form einer akuten allergischen Reaktion vom Soforttyp ist die Anaphylaxie, eine lebensgefährliche Reaktion meist auf injizierte oder oral aufgenommene Antigene.

2. Fragestellung

In *Cannabis* sind vegetabile Proteine enthalten, über deren allergene Potenz bislang wenig bekannt ist, da ein breiter Einsatz von *Cannabis* in den letzten Jahrzehnten nicht erfolgte. Dort wo *Cannabis*-Produkte in Form von Marihuana oder Haschisch genutzt wurden, geschah dies illegal. Sofern Drogenkonsumenten allergische Beschwerden bei Genuss von *Cannabis* entwickeln, ist es nicht wahrscheinlich, dass sie einen Arzt aufsuchen. Daher ist unbekannt, ob gerötete Augen und Nasen, allergischer Fließschnupfen oder Asthma bei *Cannabis*-Gebrauch das Ergebnis einer krankmachenden Überempfindlichkeit sind.

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob *Cannabis* IgE-vermittelte Sensibilisierungen induzieren kann. Hierzu wurden Proteinextrakte aus Blättern, Blüten und Samen der *Cannabis*-Pflanze gewonnen. Die Proteine wurden mittels Elektrophorese (SDS-PAGE) getrennt und die Allergene im Immunoblot detektiert. Eine Abschätzung des allergenen Potenzials der *Cannabis*-Proteine erfolgte unter Verwendung der CAP-Inhibition.

3. Material

3.1. Cannabis

Getrocknete Blätter (THC-Gehalt 2,6 %) und Blüten (THC-Gehalt 10,5 %) von *Cannabis sativa* wurden vom Bayerischen Landeskriminalamt München zur Verfügung gestellt. Eine Genehmigung der Bundesopiumstelle und des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte zum Umgang mit *Cannabis* lag vor.

Der *Cannabis*-Samen wurde im Naturkostladen Sendl in Weilheim erworben; Angaben über die Herkunftsregion konnten nicht gemacht werden.

3.2 Patienten(seren)

Für die Tests wurden insgesamt 39 Seren ausgewählt. 19 Seren stammten aus der Serothek der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, 20 Seren stellte das Institut der Rechtsmedizin der LMU München zur Verfügung. Die Seren wurden zunächst einige Wochen bei ca. -20°C in der Gefriereinheit des Kühlschranks aufbewahrt, dann erfolgte die jahrelange Lagerung in Gefriertruhen im Keller bei -80°C.

Die Patienten bzw. Probanden wurden in vier Gruppen mit speziellen Charakteristika eingeteilt. Eine atopische Diathese wurde festgestellt, wenn der Proband anamnestisch Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (Heuschnupfen oder Asthma bronchiale oder atopisches Ekzem) berichtete oder wenn im Pricktest positive Reaktionen auf verbreitete Aeroallergene (Katzenepithelien oder Hausstaubmilbe oder Gräserpollen) auftraten. Die klinischen Befunde und anamnestischen Angaben wurden den Krankenakten entnommen.

Eine Auflistung der untersuchten Patientenseren ist im Anhang unter 8.2 dargestellt. Bestimmt wurde der Gehalt an Gesamt-IgE und an spezifischen freien IgE-Antikörpern gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern und –Blüten sowie gegen Allergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides Pteronyssinus*, gegen Allergene von Pollenmischungen frühblühender Gräser und gegen Allergene von Birkenpollen. Der Gehalt an spezifischen IgE-Antikörpern wurde anhand von CAP-Klassen ermittelt (siehe Tab. 5). Mit den 19 Seren aus der Serothek

wurden Allergenbanden charakterisiert, mit drei davon ausgewählten Patientenseren wurden zusätzlich CAP-Inhibitionstests durchgeführt.

Gruppe A umfasste zwölf atopische Patienten mit Anamnese mindestens einer Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis (atopisches Ekzem oder Rhinitis allergica oder Asthma bronchiale) oder mit mindestens einer positiven Reaktion im Hautpricktest gegen verbreitete Allergene (Katzenepithelien, Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* oder Gräserpollen), mit jeweils einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel im Serum von >200 kU/l und dem Nachweis spezifischer IgE-Antikörper (\geq CAP-Klasse 2) gegen verbreitete Aeroallergene (Hausstaubmilben oder Pollen frühblühender Gräser oder Birkenpollen) im Serum. Die Patienten hatten in der Vergangenheit keinen bekannten Kontakt zu *Cannabis* oder *Cannabis*-Produkten.

Gruppe B bildeten zwei Personen: ein Mann mit privater, eine Frau mit beruflicher Marihuana-Exposition und dadurch bedingten allergischen Beschwerden in Gegenwart von *Cannabis*. In der Anamnese des männlichen Patienten kamen atopische Erkrankungen (Heuschnupfen, Asthma, atopisches Ekzem) nicht vor. Er entwickelte 15 Minuten nach dem Rauchen von Marihuana wiederholt Fließschnupfen und Asthma. Die Symptome wurden gelindert, sofern Antihistaminika (10 mg Cetirizin) vor dem Marihuana-Gebrauch eingenommen wurden. Auswärts durchgeführte Hautpricktests verliefen unauffällig gegenüber verbreiteten Aeroallergenen. Der Gesamt-IgE-Spiegel im Serum betrug 266,0 kU/l. Die weibliche Patientin war als chemisch-technische Assistentin in einem Drogendezernat beschäftigt und hatte Umgang mit Rauschmitteln. An ihrem Arbeitsplatz litt sie unter ständigem Fließschnupfen. Ihr Gesamt-IgE-Spiegel im Serum betrug 169,0 kU/l.

Gruppe C umfasste fünf Kontrollpersonen ohne Anhalt für Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis und mit jeweils einem normalen Gesamt-IgE-Spiegel von <100 kU/l. Die Probanden hatten in ihrer Vergangenheit keinen bekannten Kontakt zu *Cannabis* oder *Cannabis*-Erzeugnissen.

Gruppe D zählte zwanzig männliche und weibliche Personen, denen im Rahmen von Drogenkontrollen eine Exposition gegenüber *Cannabis* aufgrund des THC-Gehalts in ihren Seren nachgewiesen wurde (bestimmt vom Institut für Rechtsmedizin der LMU München).

4. Methoden

Im folgenden Abschnitt sind die wesentlichen inhaltlichen Aspekte der Methoden dargestellt, die für die hier erforderlichen Analyseverfahren notwendig waren. Details der Methoden finden sich im Anhang unter 8.1.

4.1 Untersuchungen mit *Cannabis*

4.1.1 Herstellung von nativen Proteinextrakten aus dem Untersuchungsmaterial

Voraussetzung für die Untersuchung des allergenen Potenzials von Proteinen ist deren möglichst vollständige Isolierung im nativen Zustand. Für ihren quantitativen und qualitativen Nachweis genügt im Allgemeinen eine einfache Präparationsmethode bei Raumtemperatur, die – trotz des verhältnismäßig geringen Proteingehalts in pflanzlichen Rohextrakten – durch enzymatische Aktivitäten zu keiner Verringerung der Allergenität des Extraktes führt. Das (im Anhang unter 8.1.5 beschriebene) Verfahren bei Normaltemperatur bewirkt eine Trennung der Zellproteine in eine lösliche und in eine Membranfraktion. Die wasserlöslichen Proteine wurden im polaren Lösungsmittel zunächst extrahiert, dann abzentrifugiert und schließlich (im abpipettierten Überstand) direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei -20°C gelagert.

4.1.2 Proteinbestimmung in *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen

Die Quantifizierung des Proteingehalts der verwendeten Extrakte erfolgte photometrisch nach der Methode von BRADFORD [191]. Als Farbreagenz diente Coomassie-Brilliant-Blau (CBB), ein Triphenylmethanfarbstoff. Die Farbreaktion beruht auf einer Anlagerung der negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Der Protein-Farbstoff-Komplex, der zu einem Farbumschlag von rotbraun nach blau führt, kann photometrisch bei 590 nm gemessen werden. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,05 µg/ml [192].

Die Messung konnte ohne weitere Aufarbeitung der Extrakte durchgeführt werden. Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte durch Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin, BSA) als Referenzprotein. (Durchführung siehe Anhang 8.1.6)

4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese basiert auf der Wanderung geladener, unterschiedlich großer Moleküle im elektrischen Gleichstromfeld. Die Trennschärfe der Elektrophorese wird durch die Wanderungsgeschwindigkeit, Pufferzusammensetzung, Temperatur, Feldstärke und Beschaffenheit des Trägermaterials beeinflusst.

Die Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine spezielle Variante der Elektrophorese, bei der Proteingemische nach LAEMMLI [193] fraktioniert werden. Das im Überschuss zugesetzte anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt die Eigenladungen der Proteine (1,4 g SDS bindet an 1 g Protein), so dass sich diese aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zu gestreckten SDS-Polypeptidketten entfalten. Die resultierenden stäbchenförmigen Partikel (Micellen) wandern im Gleichstromfeld zur Anode (Pluspol, positiver Pol) und werden dabei nach ihrer Kettenlänge getrennt [194]. Das zusätzlich im Probenpuffer enthaltene β -Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken reduktiv, was die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Das Gel stellt einen Widerstand dar, der die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beeinflusst. Deren Trennung erfolgt in restriktiven Gelen mit engen Poren, die die Wanderung großer SDS-Polypeptidketten durch Reibung stärker verlangsamen als die von kürzeren. Aus diesem Zusammenhang folgt die (umgekehrte) Proportionalität der Wanderungsgeschwindigkeit zum Molekulargewicht des Proteins: Kleinere Moleküle legen im Gel weitere Strecken zurück als größere. Als inerte Matrix wird ein Polyacrylamid-(PA)-Gel eingesetzt, das chemisch, thermisch und mechanisch besonders stabil ist. Die Porengröße ist durch die Copolymerisation von Acrylamid(monomeren) und den Vernetzungsgrad (mit N,N'-Methylenbisacrylamid) reproduzierbar definiert. Zur Trennung der Proteine wurden PA-Fertiggele vom Typ NOVEXTM NuPAGE (Novex, San Diego, CA, USA) verwendet, welche sich durch gute Reproduzierbarkeit und hohe Bandenschärfe bei geringer Trennzeit

auszeichnen [195]. Das System basiert auf einem Bis-Tris-HCl gepufferten PA-Gel mit einer Gesamtacrylamidkonzentration von 4 bzw. 12 %.

Das außerdem im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau zeigte an, wie weit die Proteine im Gel bereits gelaufen waren. Ausgewertet wurden die Proteinbanden anhand von Molekulargewichtsmarkern (Markerproteinen).

Die kontinuierliche Auftrennung der Proteine erfolgte durch Elektrophorese mit NuPAGE™ (Novex, San Diego, CA, USA). Durchführung siehe Anhang 8.1.7.

4.1.4 Unspezifische Proteinfärbungen elektrophoretisch getrennter Gele

Um elektrophoretisch getrennte Gele in der Gelmatrix sichtbar zu machen, wurden zwei Färbemethoden angewendet.

4.1.4.1 Silberfärbung

Die etwas aufwändigere Silberfärbung ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode für Proteine (Nachweisgrenze 0,05-0,1 ng Protein pro mm²) [196]. Der Silberfärbung im Gel nach HEUKESHOVEN und DERNICK [197] liegt die Reduktion von Silberionen (aus einer Silbernitratlösung) zu elementarem Silber (Dunkelfärbung der Proteinbanden) zugrunde. Zunächst werden die Proteine mit Essigsäure im Gel fixiert und dann (zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweises) mit Natriumthiosulfat imprägniert. Glutardialdehyd vernetzt die Proteine, Silberionen wirken als Komplexbildner für Proteine. Spülen entfernt die freien Silberionen; diejenigen, die am Protein gebunden sind, verbleiben im Gel. Durch chemische Reduktion mit Formaldehyd werden die fixierten Silberionen zu metallischem Silber reduziert. Diese Reaktion wird durch Waschen abgebrochen und die mit EDTA komplex gebundenen überschüssigen Silberionen aus dem Gel entfernt. Durch die Silberfärbung werden Proteine irreversibel denaturiert. (Durchführung siehe Anhang 8.1.8.1)

4.1.4.2 Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Bei dieser Methode handelt es sich um eine reversible Proteinfärbung mit dem Farbstoff CBB. Ein Vorteil dieses Färbprinzips ist, dass die Anlagerung des Farbstoffs an die Proteine quantitativ und ohne deren Denaturierung erfolgt. Die Proteine im Gel werden dabei nach einer abgeänderten Methode von FLING und GREGERSON [198] mit einem Essigsäure-/Methanol-Gemisch fixiert und dann mit CBB angefärbt. Die Färbungen sind zwar einfach durchzuführen, allerdings auch recht unempfindlich (Nachweisgrenze 30 ng Protein pro mm²). In einem nachfolgenden Waschschrift wird der Hintergrund wieder entfärbt und die Proteine werden als blaue Banden sichtbar. (Durchführung siehe Anhang 8.1.8.2)

4.1.5 Westernblot

Beim Westernblot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische aus der PA-Matrix (Transferrigel) über ein elektrisches Gleichstromfeld eluiert, auf eine Nitrocellulose-(NC)-Membran transferiert und dort immobilisiert [199]. Transferrigel und Membran werden sandwichartig von Puffer getränkten Filterpapieren (als Ionenreservoir) eingerahmt und zwischen die Elektroden gelegt. Die Proteine wandern vom Transferrigel in Richtung Anode und werden auf der NC-Membran gebunden. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten (Durchführung siehe Anhang 8.1.9). Die Bindung der Proteine an die NC-Membran findet sehr wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen statt [200], und die Bindungskapazität steigt mit abnehmender Porengröße der NC-Membran [201]. Eine teilweise Renaturierung der Proteine (nach dem Auswaschen des angelagerten SDS) mit dem Methanol des Puffers bis zur Tertiärstruktur wird vermutet. Dadurch können die freizugänglichen Proteine von spezifischen IgE-Antikörpern erkannt werden, was Voraussetzung für die Identifikation der allergenen Proteine (in Proteinbanden) im Immunoblot (IB) ist.

4.1.6 Immunoblot (Immundetektion)

Bei der Immundetektion binden die auf eine (Western-)Blotmembran transferierten Proteine spezifische IgE-Antikörper aus Humansenen [202]. Nach deren Inkubation mit enzymmarkierten Detektionsantikörpern und Färbung mit einem Entwicklerreagenz können allergene Proteine visualisiert und von nicht-allergenem unterschieden werden.

Nach dem Transfer werden zunächst - zur Vermeidung unspezifischer Bindungen – frei bleibende Bindungsstellen der NC-Membran mit Blockierungslösung aus Magermilchpulver [203, 204] abgesättigt. Darauf folgt die Erstinkubation der immobilisierten Allergene mit spezifischen IgE-Antikörpern aus Patientenseren. Um die an immobilisierte Proteine gebundenen spezifischen IgE-Antikörper zu visualisieren, werden sie mit (monoklonalen) enzymmarkierten Anti-Human-IgE-Antikörpern (aus der Maus) inkubiert, welche alkalische Phosphatase AP (mehrfach) konjugiert enthalten (Anti-IgE-Enzymkonjugat). In einer Zweitinkubation binden diese Nachweisantikörper unter Ausbildung eines "Sandwich"-Komplexes an die Erstantikörper. Durch Zugabe der Substratlösung (Substrat-Chromogen-Mischung) für AP, 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Kaliumsalz (BCIP), werden die Proteinbanden am IB-Streifen sichtbar. Bei dieser Farbreaktion setzt die - im „Sandwich“-Komplex gebundene - AP BCIP unter Oxidation und Dimerisierung zu einem blauen Indigofarbstoff um, wobei gleichzeitig NBT reduziert wird und den purpurroten Farbstoff Diformazan ergibt. Beide Farbstoffe lagern sich an die Bindungsstellen der AP und zeigen damit die Antikörperreaktivität an [205]. Die allergenen Proteine erscheinen als blau gefärbte Linien. (Durchführung siehe Anhang 8.1.10)

4.1.7 Biotinylierung

Die Biotinylierung wird zur Markierung von Proteinen für die Anwendung im CAP-FEIA eingesetzt. Ein Allergen wird mit Biotin markiert, indem die freien Aminogruppen des Proteins mit Biotin-7-NHS stabile Säureamidbindungen bilden. Anschließend wird die hohe Affinität von Biotin für Avidin genutzt.

Mit dem Verfahren werden Biotin-markierte Proteine von anderen makromolekularen Stoffen isoliert. Man benutzt dazu eine Chromatographiesäule als Trägermatrix, deren Oberfläche mit Blockierungsreagenz abgesättigt ist, um unspezifische Bindungen des markierten Proteins an das Säulenmaterial (und damit Ausbeuteverluste) zu vermeiden. Dann gibt man das biotinylierte Protein auf die vorbereitete Chromatographiesäule, die Avidin als Festphasen-Reaktand kovalent gebunden enthält. Bei der molekularen Erkennungsreaktion bindet das Biotin (nicht kovalent) an das Avidin. Nicht gebundene Stoffe werden von der Oberfläche gewaschen. Die Avidin-Biotin-assoziierten Proteine lassen sich anschließend durch Pufferlösungen wieder trennen und von der Grenzfläche eluieren: Die schwereren markierten Proteine passieren schneller die Säule und können zuerst aufgefangen werden. Es liegen schließlich isolierte biotinylierte Allergene vor. (Durchführung siehe Anhang 8.1.11)

4.1.8 Herstellung der CAPs für die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper gegen *Cannabis*

Die Kopplung der biotinylierten *Cannabis*-Proteine (aus Extrakten von *Cannabis*-Blättern und -Blüten, Herstellung siehe unter den Abschnitten 4.1.1, 4.1.7 und Anhang 8.1.11) erfolgte im UNICAP 100 Gerät (Phadia Freiburg) automatisiert an - durch Streptavidin aktivierte - Cellulose-Schwämmchen (CAPs) als Festphase.

4.2 Bestimmung verschiedener IgE-Antikörper im Blutserum

4.2.1 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper im Blutserum mittels CAP-FEIA

Die Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper in den Blutseren erfolgte mit dem CAP-System (Phadia Freiburg). Hier sind an die Festphase (hydrophiles, stark verzweigtes Kohlenhydratpolymer) Allergene gebunden. Wird nun Patientenserum hinzugefügt, binden sich die passenden spezifischen IgE-Antikörper an das Festphasenallergen und formen einen Antigen-Antikörper-Komplex. Nach Waschen werden ca. 1 µg/ml enzymmarkiertes Anti-IgE-Antikörper-Konjugat (β-Galaktosidase-Anti-IgE) hinzugefügt, das wiederum mit dem

fixierten Serum-IgE einen Komplex bildet (Sandwich-Immunotest). Danach wird ungebundenes enzymmarkiertes Anti-IgE abgewaschen und der gebundene Sandwich-Komplex mit 0,01%igem Entwicklerreagenz (4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktosid) als Substrat versetzt. Das im Konjugat enthaltene Enzym β -Galaktosidase spaltet das Substrat, was zur Bildung eines fluoreszierenden Farbstoffes führt. Nach Abstoppen der Reaktion wird die Fluoreszenz des Eluats gemessen: Die Fluoreszenz ist das generierte Signal, das der IgE-Konzentration der Serumprobe direkt proportional ist (Fluoreszenz-Enzym-Immunoassay, FEIA).

Es wurden die spezifischen IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern und – Blüten, gegen Allergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*, gegen Allergene von Pollenmischungen früh blühender Gräser und gegen Allergene von Birkenpollen ermittelt (anhand Tabelle 5).

Tab. 4: Verwendete Allergene (CAP-FEIA)

CODE	Allergenquelle
d 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
g x 1	Pollenmischung der frühblühenden Gräser: Knäuelgras, Wiesenschwingel, Lolch, Lieschgras, Wiesenrispengras
t 3	Birkenpollen

Die gemessenen Werte wurden als kU/l berechnet und daraus gemäß den Angaben in der Tabelle 5 die jeweilige CAP-Klasse ermittelt.

Tab. 5: Einteilung der CAP-Klassen

Messbereich der spezifischen IgE-Antikörper (kU/l)	CAP- Klasse	Beurteilung der Konzentration spezifischer IgE-Antikörper
< 0,35	0	Keine spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar
0,35 - < 0,7	1	niedrig
0,7 - < 3,5	2	mittel
3,5 - < 17,5	3	hoch
17,5 - < 50,0	4	sehr hoch
50,0 - 100,0	5	sehr hoch
> 100,0	6	sehr hoch

4.2.2 Bestimmung des Gesamt-IgE-Gehalts im Blutserum mittels ImmunoCAP

Die Konzentration des zirkulierenden Gesamt-IgE im menschlichen Serum wurde mittels ImmunoCAP (Phadia Freiburg) bestimmt. Die Festphase (vgl. 4.2.1) enthält Anti-IgE-Antikörper kovalent gebunden. Die Anti-IgE-Antikörper binden nach Inkubation IgE-Antikörper aus dem Serum. Nach Waschen können die fixierten IgE-Antikörper mit entsprechend enzymmarkierten Anti-IgE-Antikörpern messbar gemacht werden (Sandwich-Methode, siehe 4.2.1).

4.3 Korrelationen der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper im Serum gegen unterschiedliche Allergene

Die statistische Auswertung der Messwerte für Korrelationen von spezifischem Serum-IgE gegen unterschiedliche Allergene erfolgte unter Verwendung von Microsoft Windows XP, Microsoft Excel sowie SPSS 13.0

Zur Anwendung kamen die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes mit Angabe der Standardabweichung, die Berechnung von Medianen sowie der zweiseitige Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben.

Der lineare Zusammenhang zwischen zwei stetigen Merkmalen wurde mithilfe des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r als Maßzahl untersucht.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als signifikant (mit > 95 % Wahrscheinlichkeit) beurteilt. Ein Wert von $p > 0,05$ wurde als nicht signifikant betrachtet (mit < 95 % Wahrscheinlichkeit). Bei einem p -Wert zwischen 0,05 und 0,1 wurde ein statistischer Trend angenommen.

4.4 CAP-Inhibition

Die CAP-Inhibition stellt eine Variante der spezifischen IgE-Bestimmung mittels CAP-System dar. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Hemmtest, der eine Abschätzung der Allergenverwandtschaft und damit der Kreuzreaktivität verschiedener Antigene erlaubt.

Wird die Kreuzreaktivität überprüft, wird vor der Messung der Inhibition ein Patientenserum - mit bekanntem Gehalt an spezifischem IgE (bekannte CAP-Klasse) - mit einem auf seine allergene Potenz zu untersuchenden löslichen Extrakt (Inhibitorlösung) vorinkubiert [206]. Dabei kommt es zur indirekten Konkurrenzreaktion zwischen den sich frei in der (Inhibitor-) Lösung befindlichen und den festphasengebundenen Allergenen um die spezifischen IgE-Antikörper im Patientenserum. Bei der CAP-Messung des abzentrifugierten Überstandes wird überprüft, inwieweit – in einem ersten Schritt - die Zugabe der löslichen (Inhibitor-)Allergene die Bindung der spezifischen IgE-Antikörper – in einem zweiten Schritt - an die festphasengekoppelten Antigene hemmen kann. Bei einem kreuzreagierenden (Inhibitor-)Allergen werden spezifische IgE-Antikörper aus dem Serum während der Vorinkubation vom (Inhibitor-)Antigen abgefangen. Diese gebundenen spezifischen IgE-Antikörper sind somit im Überstand nicht mehr vorhanden und bei der folgenden CAP-Untersuchung nicht mehr zu finden. Die Inhibition ist also die Reduktion der Bindung der spezifischen IgE-Antikörper am festphasengebundenen Allergen durch Vorinkubation. Je größer das Hemmvermögen des eingesetzten (Inhibitor-)Extraktes ist, desto stärker sinkt das Messsignal. In den Untersuchungen wurden jeweils Verdünnungsreihen von Allergen-(Inhibitor-)Extrakten eingesetzt.

Zur Überprüfung der methodischen Richtigkeit der Tests wird stets eine Eigeninhibition (homologe Inhibition, Autoinhibition) mit den Allergenen durchgeführt, die festphasengebunden vorliegen. Es kommt im Idealfall zu einer vollständigen Aufhebung des Messsignals [207]. (Durchführung siehe Anhang 8.1.12)

Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt anhand von Inhibitionskurven als Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der Allergenkonzentration des Inhibitor-Extraktes. Bei der Berechnung der Inhibition wurden die gemessenen IgE-Bindungen des (Puffer-)Basiswerts gleich 0 % gesetzt. Um die prozentuale Inhibition zu errechnen, wurde der Quotient aus „ $\text{Messwert}_{\text{Inhibition}} / \text{Messwert}_{\text{Pufferkontrolle}} \times 100$ “ von 100 subtrahiert.

5. Ergebnisse

5.1 Klinische Daten der Patienten

Es wurden insgesamt 39 Probanden in die Untersuchung einbezogen. Von 19 Patienten (Gruppe A, B, und C) waren anamnestische Daten bekannt, von 20 anonymen Personen (Gruppe D) standen nur Seren zur Verfügung. Eine Übersicht der Patientencharakteristika findet sich in Tabelle 6.

Tab. 6: Übersicht über das Probandenkollektiv

Probandenkollektiv n = 39	Geschlecht	Medianes Alter in Jahren (Spannweite)	Gesamt-IgE (kU/l) Spannweite	Atopische Erkrankung
Atopische Patienten (Gruppe A) n = 12	m, 5 w, 7	35 (17 – 62)	255 - 2243	vorhanden
Personen mit <i>Cannabis</i> -Exposition (Gruppe B) n = 2	m, 1 w, 1	44 (34 – 55)	169 - 266	vorhanden
Kontrollpersonen (Gruppe C) n = 5	m, 0 w, 5	43 (36 – 55)	5 - 79	nicht vorhanden
Drogenkonsumenten (Gruppe D) n = 20	KA	KA	2 - 406	UB

m = männlich; w = weiblich; KA = keine Angaben; UB = unbekannt

Bei Gruppe A (Tab. 7) waren die Selektionskriterien der zwölf Patienten mindestens eine anamnestische Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis (atopisches Ekzem oder Rhinitis allergica oder Asthma bronchiale) oder zumindest eine positive Reaktion im Hautpricktest gegen verbreitete Allergene (Katzenepithelien, Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* oder Gräserpollen), ein erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel im Serum (>200 kU/l) als auch ein erhöhter spezifischer IgE-Gehalt im Serum (\geq CAP-Klasse 2) gegen wenigstens ein verbreitetes Aeroallergen (Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*, Pollen frühblühender Gräser oder Birkenpollen). Die Patienten hatten in der Vergangenheit keinen bekannten Kontakt zu *Cannabis* oder *Cannabis*-Produkten.

Bei Gruppe B (Tab. 8) handelte es sich um zwei Personen, die durch private oder berufliche *Cannabis*-Exposition allergische Beschwerden entwickelten.

Die Kontrollgruppe C (Tab. 9) setzte sich aus fünf Personen ohne Befunde für eine atopische Veranlagung zusammen. Die Probanden hatten in der Vergangenheit keinen wesentlichen Kontakt zu *Cannabis* oder *Cannabis*-Erzeugnissen.

Die Gruppe D (Tab. 10) umfasste zwanzig Personen, denen im Rahmen von Drogenkontrollen eine Exposition gegenüber *Cannabis* aufgrund des THC-Gehalts in ihren Seren nachgewiesen wurde. Angaben über den jeweiligen Atopiestatus konnten nicht gemacht werden.

Tab. 7: Charakteristika der Patienten aus Gruppe A

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gesamt- IgE (kU/l)	Atopie-Parameter				
				RCA	AB	AE	KMG	spez. IgE Aero
1	m	26	851,0	RCA	AB	AE	KMG	spez. IgE Aero
2	m	36	1217,0	RCA	-	AE	KMG	spez. IgE Aero
3	m	55	600,0	-	-	-	-	spez. IgE Aero
4	m	36	955,0	RCA	-	-	KMG	spez. IgE Aero
5	w	62	1704,0	-	AB	-	-	spez. IgE Aero
6	w	41	1982,0	-	-	AE	-	spez. IgE Aero
7	w	23	698,0	-	-	AE	-	spez. IgE Aero
8	w	21	926,0	-	-	-	-	spez. IgE Aero
9	w	22	1586,0	-	AB	AE	KMG	spez. IgE Aero
10	w	17	255,0	-	-	-	KMG	spez. IgE Aero
11	w	24	287,0	-	-	AE	-	spez. IgE Aero
12	m	60	2243,0	-	-	-	-	spez. IgE Aero

m = männlich; w = weiblich;

RCA = Rhinokonjunktivitis allergica; AB = Asthma bronchiale; AE = Atopisches Ekzem;

KMG = Sensibilisierung gegen Allergene von Katzenepithelien, Hausstaubmilben oder Gräserpollen im Hautpricktest;

spez. IgE Aero = spezifisches IgE (\geq CAP-Klasse 2) im Serum gegen Allergene von Hausstaubmilben, Gräser- oder Birkenpollen

Tab. 8: Charakteristika der Personen aus Gruppe B

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gesamt-IgE (kU/l)	Atopie-Parameter		
13	m	34	266,0	RCA	-	-
14	w	55	169,0	RCA	KMG	spez. IgE Aero

m = männlich; w = weiblich;

RCA = Rhinoconjunctivitis allergica;

KMG = Sensibilisierung gegen Allergene von Katzenepithelien, Hausstaubmilben oder Gräserpollen im Hautpricktest;

spez. IgE Aero = spezifisches IgE (\geq CAP-Klasse 2) im Serum gegen Allergene von Hausstaubmilben, Gräser- oder Birkenpollen

Tab. 9: Charakteristika der Probanden aus Kontrollgruppe C

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gesamt-IgE (kU/l)	Atopie-Parameter
15	w	37	11,9	-
16	w	41	16,9	-
17	w	42	79,1	-
18	w	36	5,2	-
19	w	58	17,3	-

m = männlich; w = weiblich

Tab. 10: Charakteristika der anonymen Drogenkonsumenten aus Gruppe D

Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gesamt-IgE (kU/l)	Atopie-Parameter
20	KA	KA	50,8	UB
21	KA	KA	26,7	UB
22	KA	KA	18,1	UB
23	KA	KA	43,0	UB
24	KA	KA	41,2	UB
25	KA	KA	44,7	UB
26	KA	KA	406,0	UB
27	KA	KA	96,7	UB
28	KA	KA	246,0	UB
29	KA	KA	61,1	UB
30	KA	KA	57,2	UB
31	KA	KA	92,6	UB
32	KA	KA	122,0	UB
33	KA	KA	2,0	UB
34	KA	KA	8,4	UB
35	KA	KA	13,7	UB
36	KA	KA	16,7	UB
37	KA	KA	2,0	UB
38	KA	KA	64,3	UB
39	KA	KA	11,6	UB

KA = Keine Angaben; UB = unbekannt

5.2 Proteinbestimmung in den *Cannabis*-Extrakten

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung nach BRADFORD [200] ergaben sich als Mittelwerte aus den photometrischen Messungen (Doppelbestimmungen) nativer Extrakte von *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen, die unverdünnt sowie 1:2 und 1:4 verdünnt eingesetzt wurden (vgl. Tab. 11).

Tab. 11: Proteingehalte der *Cannabis*-Extrakte nach BRADFORD [200]

Extrakt	Proteingehalt
<i>Cannabis</i> -Blätter	390 µg/ml
<i>Cannabis</i> -Blüten	318 µg/ml
<i>Cannabis</i> -Samen	332 µg/ml

Der Proteingehalt des *Cannabis*-Blattextraktes war mit 390 µg/ml am höchsten; die Proteingehalte sowohl des *Cannabis*-Samenextraktes als auch des *Cannabis*-Blütenextraktes lagen geringfügig niedriger.

5.3 Proteinmuster der *Cannabis*-Extrakte nach Silberfärbung und Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Die Proteinmuster der mittels SDS-PAGE getrennten Proteinextrakte von *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen wurden nach MÖLLER et al. [216] unspezifisch mit Silberfärbung (Abb. 5) bzw. mit CBB-Färbung (Abb. 6) visualisiert. Die Abschätzung der MG der *Cannabis*-Proteine erfolgte durch Extrapolation (Abb. 7). Eine gute Trennung der Proteine war Voraussetzung für die nachfolgenden Untersuchungen mittels IB.

Die Trennung der Proteine im MG-Bereich von 11 kDa bis 98 kDa war deutlich (Abb. 5). Sowohl die unverdünnten als auch verdünnten *Cannabis*-Blatt-, Blüten- und Samenextrakte wiesen übereinstimmende und intensive Proteinbanden bei 11 kDa, 19 kDa, 31 kDa, 39 kDa, 52 kDa und 98 kDa auf. Bei *Cannabis*-Blüten- und -Samenextrakten wurden zusätzlich schwache Banden bei 43 kDa detektiert. Diffuse Banden waren bei allen Proteinextrakten im MG-Bereich größer als 98 kDa zu erkennen. Eine sehr schwache Bande bei 6 kDa ließ sich bei unverdünntem *Cannabis*-Blattextrakt erahnen.

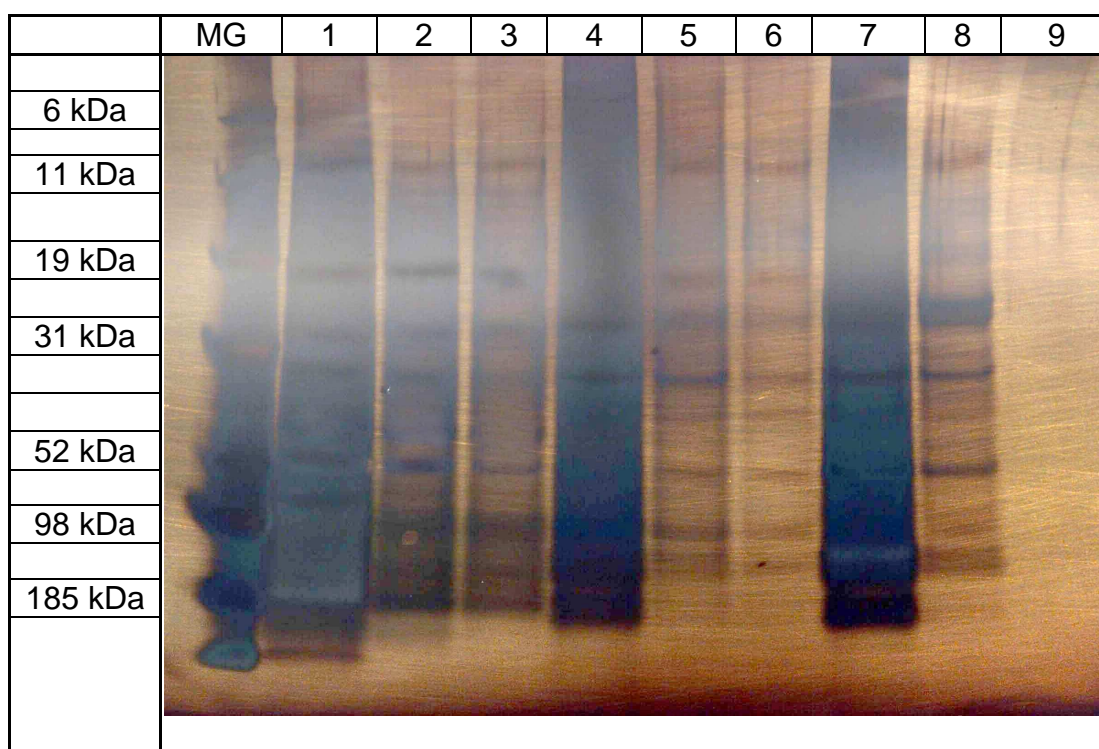


Abb. 5: Silberfärbung des Proteinmusters von *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen (nach SDS-PAGE)

MG: Molekulargewichtsmarker

- 1: *Cannabis*-Blattextrakt unverdünnt
- 2: *Cannabis*-Blattextrakt 1:2 verdünnt
- 3: *Cannabis*-Blattextrakt 1:4 verdünnt
- 4: *Cannabis*-Blütenextrakt unverdünnt
- 5: *Cannabis*-Blütenextrakt 1:2 verdünnt
- 6: *Cannabis*-Blütenextrakt 1:4 verdünnt
- 7: *Cannabis*-Samenextrakt unverdünnt
- 8: *Cannabis*-Samenextrakt 1:2 verdünnt
- 9: *Cannabis*-Samenextrakt 1:4 verdünnt

Die CBB-gefärbten Extrakte (Abb. 6) zeigten wesentlich weniger Banden als die silbergefärbten, die auch weniger intensiv und scharf waren. Eine klare Bande bei 6 kDa war bei unverdünntem *Cannabis*-Blütenextrakt zu sehen. Eine weitere diskrete Bande war bei 11 kDa bei allen unverdünnten Extrakten zu erkennen, die weniger deutlich bei den 1:2 verdünnten *Cannabis*-Blatt- und Blütenextrakten ausfiel und beim verdünnten *Cannabis*-Samenextrakt gänzlich fehlte. Eine diffuse Bande bei 17 kDa war im unverdünnten und 1:2 verdünnten *Cannabis*-Blütenextrakt visualisiert. Eine sehr intensive Bande bei 19 kDa zeigte sich bei allen unverdünnten Extrakten, die wesentlich schwächer bei den 1:2 verdünnten *Cannabis*-Blatt- und -Blütenextrakten ausgeprägt war und bei verdünntem *Cannabis*-Samenextrakt fehlte. Bei 31 kDa war in allen unverdünnten Extrakten eine unscharfe Bande

erkennbar. Bei 52 kDa fand sich bei allen unverdünnten Extrakten eine weitere deutliche Bande, die nur noch bei den verdünnten *Cannabis*-Blattextrakten erkennbar war. Bei 39 kDa und 98 kDa waren diffuse Banden bei den unverdünnten *Cannabis*-Blattextrakten zu sehen.

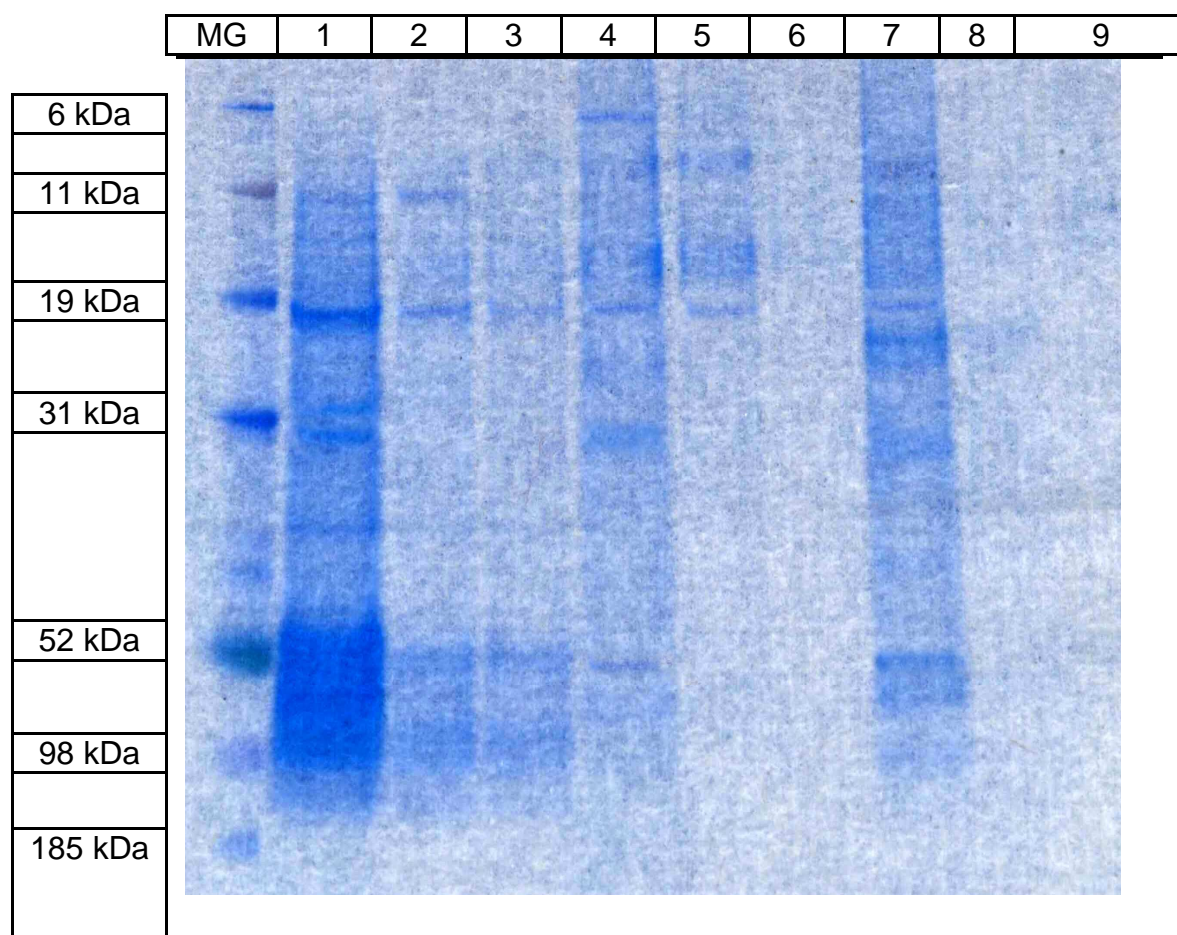
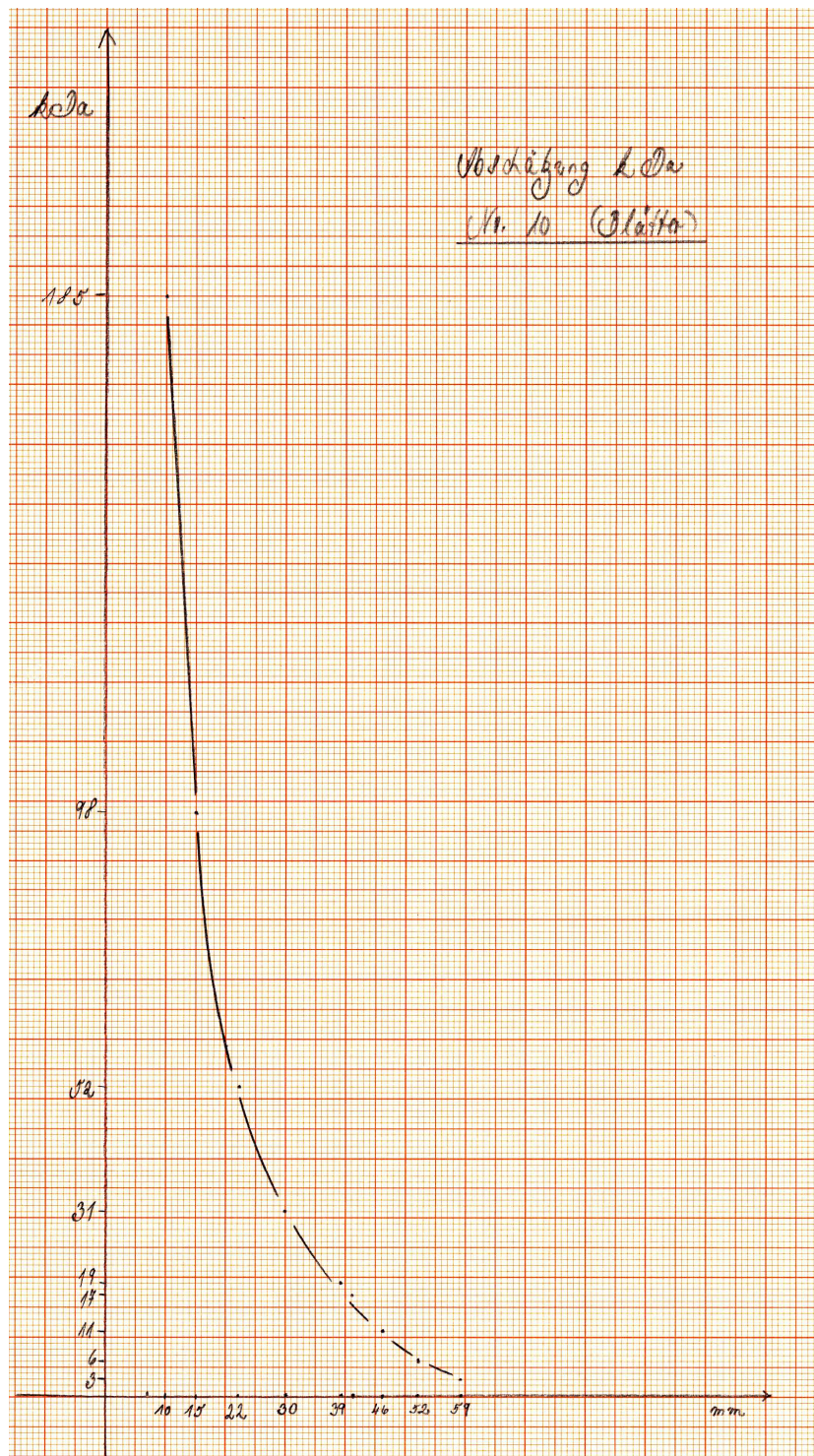


Abb. 6: CBB-Färbung des Proteinmusters aus *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen (nach SDS-PAGE)

MG: Molekulargewichtsmarker

- 1: *Cannabis*-Blattextrakt unverdünnt
- 2: *Cannabis*-Blattextrakt 1:2 verdünnt
- 3: *Cannabis*-Blattextrakt 1:4 verdünnt
- 4: *Cannabis*-Blütenextrakt unverdünnt
- 5: *Cannabis*-Blütenextrakt 1:2 verdünnt
- 6: *Cannabis*-Blütenextrakt 1:4 verdünnt
- 7: *Cannabis*-Samenextrakt unverdünnt
- 8: *Cannabis*-Samenextrakt 1:2 verdünnt
- 9: *Cannabis*-Samenextrakt 1:4 verdünnt

Die Abschätzung der MG von Proteinen aus *Cannabis*-Blattextrakt erfolgte durch graphische Ableitung (Abb. 7). Die extrapolierten MG silbergefärbter Proteine aus *Cannabis*-Blattextrakt sind in Tabelle 12 zusammengefasst.



Rechtswertachse:
Lauffront der Markerproteine
in Millimeter

Hochwertachse:
MG der Markerproteine in kDa

Abb. 7: Abschätzung der MG von Proteinen aus *Cannabis*-Blättern durch graphische Ableitung

Tab. 12: Extrapolation der MG silbergefärbter Proteine aus *Cannabis*-Blattextrakt

Lauffront	Extrapoliertes MG
59 mm	3 kDa
52 mm	6 kDa
46 mm	11 kDa
41 mm	17 kDa
39 mm	19 kDa
30 mm	31 kDa
26 mm	39 kDa
24 mm	43 kDa
22 mm	52 kDa
15 mm	98 kDa

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten und silbergefärbten Proteinextrakte aus *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen zeigten konkordante Bandenmuster sowohl im niederen als auch mittleren und höheren MG-Spektrum (Tab. 13). Deutlich übereinstimmende und intensive Proteinbanden waren in allen Extrakten im Bereich 11 kDa, 19 kDa, 31 kDa, 39 kDa, 52 kDa visualisierbar. Bei unverdünntem *Cannabis*-Blattextrakt zeigte sich bei 6 kDa eine sehr schwache Bande, die bei unverdünntem CBB-gefärbten *Cannabis*-Blütenextrakt deutlich auffiel. Eine diffuse Bande bei 17 kDa war nur bei CBB-gefärbten *Cannabis*-Blütenextrakten zu sehen. Beim *Cannabis*-Blüten- und -Samen-Extrakt wurde zusätzlich eine schwache Bande bei 43 kDa detektiert. Diffuse Banden waren bei allen Proteinextrakten im MG-Bereich von 98 kDa zu erkennen.

Tab. 13: Kongruente MG silbergefärbter Proteinextrakte aus *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen

MG	<i>Cannabis</i> -Blattextrakt	<i>Cannabis</i> -Blütenextrakt	<i>Cannabis</i> -Samenextrakt
6 kDa	sehr schwach	- *	-
11 kDa	+	+	+
17 kDa	-	- **	-
19 kDa	+	+	+
31 kDa	+	+	+
39 kDa	+	+	+
43 kDa	-	schwach	schwach
52 kDa	+	+	+
98 kDa	+	+	+

*positiv nur bei CBB-Färbung

**diffus nur bei CBB-Färbung

5.4 Immunoblotuntersuchung zur Charakterisierung der *Cannabis*-Allergene

Mit den Patientenseren der Gruppen A-C wurden IB-Untersuchungen vorgenommen. Der mittels SDS-PAGE getrennte und auf eine NC-Membran transferierte Proteinextrakt von *Cannabis*-Blättern, –Blüten und –Samen wurde mit 19 Seren inkubiert und dann die Bindung spezifischer IgE-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildungen 8-11 stellen die Ergebnisse solcher IB-Untersuchungen dar.

Der IB von *Cannabis*-Blattextrakt mit 12 Seren atopischer Patienten (Nr. 1-12) der Gruppe A und mit 5 Seren (Nr. 15-19) nicht sensibilisierter Probanden der Kontrollgruppe C lässt mehrere Allergenbanden erkennen (vgl. Abb. 8). Mit 8 Seren (Nr. 1, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12) wurden deutlich Allergene im mittleren MG-Bereich von 31 kDa, 39 kDa und 52 kDa visualisiert. Mit denselben Seren wurden unscharf Allergene im MG-Bereich von 98 kDa sichtbar. Mit den Seren Nr.1 und 12 ließen sich zusätzlich diskrete Allergenbanden im niederen MG-Bereich von 11 kDa, 17 kDa und 19 kDa identifizieren. Das Kontrollserum Nr. 18 zeigte drei schwache Banden im MG-Bereich von 31 kDa, 43 kDa und 52 kDa. Die Seren Nr. 2, 4 und 10 sowie die Kontrollseren Nr. 15, 16, 17 und 19 detektierten nicht.

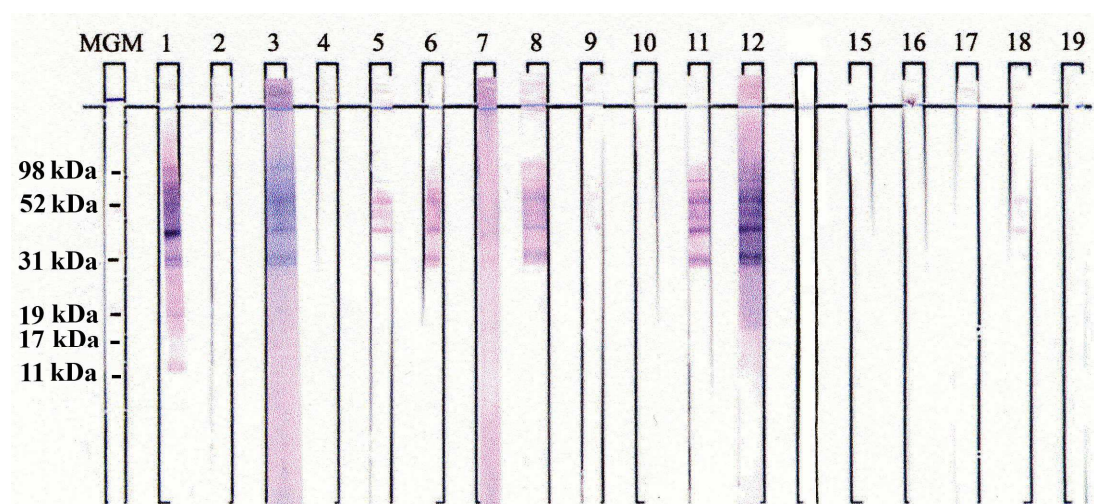


Abb. 8: IgE-Immunoblot mit *Cannabis*-Blattextrakt

MGM-Streifen: MG-Marker

1-12: Seren atopischer Patienten (Gruppe A)

15-19: Kontrollseren nicht sensibilisierter Probanden (Gruppe C)

Der IB mit *Cannabis*-Blütenextrakt (Abb. 9) zeigte ein vergleichbares Ergebnis wie der IB mit *Cannabis*-Blattextrakt (Abb. 8). Der *Cannabis*-Blütenextrakt wurde ebenfalls mit 12 Seren atopischer Patienten der Gruppe A (Nr. 1-12) und mit 5 Seren nicht sensibilisierter Probanden der Kontrollgruppe C (Nr. 15-19) inkubiert. Im IB des *Cannabis*-Blütenextraktes waren die Allergenbanden jedoch schärfer und zahlreicher als im IB des *Cannabis*-Blattextraktes. Im IB des *Cannabis*-Blütenextraktes detektierten die Patientenseren Nr. 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 und 12 intensiv Allergene im mittleren MG-Spektrum von 31 kDa bis 52 kDa. Intensiver waren im IB des *Cannabis*-Blütenextraktes die beiden Proteinbanden mit den MG von 39 kDa und 43 kDa zu erkennen. Bei 98 kDa waren die Banden diffus. Durch fünf Seren (Nr. 1, 3, 6, 8, und 12) wurden deutlich niedermolekulare Proteine mit den MG von 17 kDa bis 19 kDa detektiert. Die Seren Nr. 5, 7 und 11 erkannten nur ein 19 kDa-Allergen. Die Seren Nr. 1, 3, 8 und 12 visualisierten zusätzlich ein 11 kDa-Protein. Das Patientenserum Nr. 2 und das Kontrollserum Nr. 18 ließen – im Gegensatz zum IB des *Cannabis*-Blattextraktes – drei deutliche Banden im mittleren MG-Spektrum (31 kDa bis 52 kDa) erkennen. Die Patientenseren Nr. 4 und Nr. 10 sowie die Kontrollseren Nr. 15, 16, 17 und 19 detektierten (wie auch im *Cannabis*-Blattextrakt) nicht.

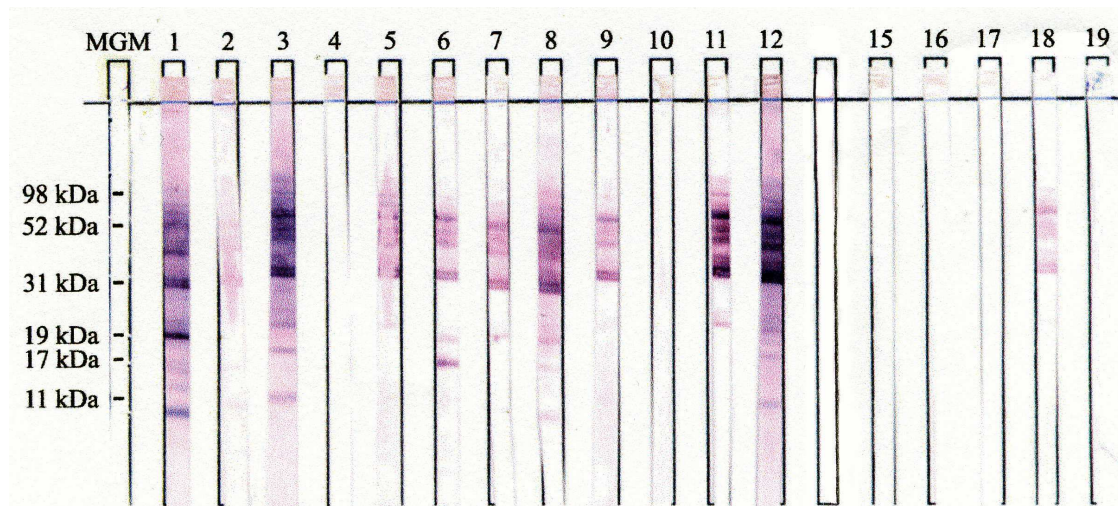


Abb. 9: IgE-Immunoblot mit *Cannabis*-Blütenextrakt

MGM-Streifen: MG-Marker

1-12: Seren atopischer Probanden (Gruppe A)

15-19: Kontrollseren nicht sensibilisierter Probanden (Gruppe C)

Weitere IB-Ergebnisse mit *Cannabis*-Blatt- und -Blütenextrakt zeigten die fünf Kontrollseren (Nr. 15-19) aus Gruppe C und die beiden Seren (Nr. 13-14) aus Gruppe B (vgl. Abb. 10). Die Beobachtungen bei den Kontrollseren entsprachen den bisherigen Befunden der IB-Untersuchungen von *Cannabis*-Blatt- und Blütenextrakten (siehe Abb. 8-9). Das Serum Nr. 13 detektierte sowohl im *Cannabis*-Blattextrakt (vgl. Abb. 10 links) als auch im *Cannabis*-Blütenextrakt (vgl. Abb. 10 rechts) jeweils deutlich bei 11 kDa. Das Serum Nr. 14 detektierte nicht.

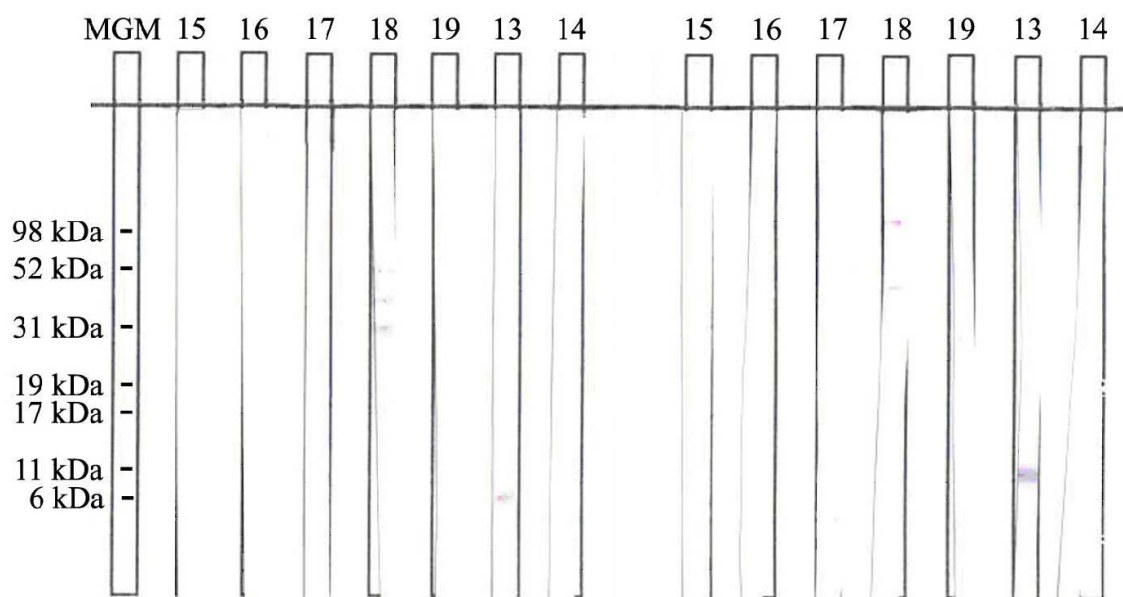


Abb. 10: IgE-Immunoblot mit *Cannabis*-Blattextrakt (links) und -Blütenextrakt (rechts)

MGM-Streifen: MG-Marker

15-19: Kontrollseren nicht sensibilisierter Probanden (Gruppe C)

13: Serum einer Person mit privater *Cannabis*-Exposition (Gruppe B)

14: Serum einer Person mit beruflicher *Cannabis*-Exposition (Gruppe B)

Im IB mit *Cannabis*-Samenextrakt visualisierten 18 Seren (Gruppen A-C) kongruente Allergenbanden, die jedoch nicht so zahlreich wie im *Cannabis*-Blatt- und -Blütenextrakt ausfielen (vgl. Abb. 11). Acht Seren (Nr. 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11 und 12) atopischer Patienten (Gruppe A) detektierten mehrere Allergenbanden schwach im mittleren MG-Bereich (31 kDa bis 52 kDa). Die Banden bei 98 kDa zeigten sich diffus. Die Seren Nr. 1, 3, 5, 7, 8, 9 und 12 visualisierten schwach ein Allergen bei 19 kDa. Das Serum Nr. 13 (Gruppe B) detektierte nicht. Auffallend ist, dass das Serum Nr. 14 (Gruppe B) eine Allergenbande (bei 17 kDa) erkannte. Das Serum Nr. 1 detektierte (wie im *Cannabis*-Blatt- und -Blütenextrakt) Allergene bei 17 kDa und bei 11 kDa. Die Kontrollseren Nr. 15, 16, 17 (Gruppe C) detektierten nicht, das Kontrollserum Nr. 18 (Gruppe C) nur schwach bei 31 kDa.

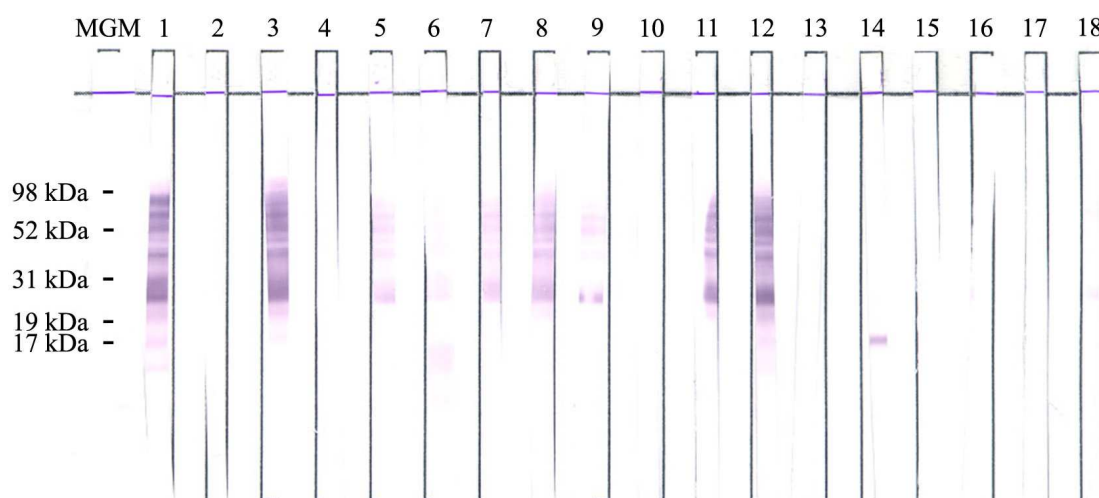


Abb. 11: IgE-Immunoblot mit *Cannabis*-Samenextrakt

MGM-Streifen: MG-Marker

1-12: Seren atopischer Patienten (Gruppe A)

13: Serum einer Person mit privater *Cannabis*-Exposition (Gruppe B)

14: Serum einer Person mit beruflicher *Cannabis*-Exposition (Gruppe B)

15-18: Kontrollseren nicht sensibilisierter Probanden (Gruppe C)

Die über einen Vergleich mit dem Marker geschätzten MG der Allergene aus *Cannabis*-Proteinextrakten, die durch die spezifischen IgE-Antikörper der einzelnen Seren im IB erkannt wurden, sind nachfolgend im Überblick dargestellt (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Detektion von Allergenen in *Cannabis*-Blatt-, -Blüten- und Samenextrakten durch spezifische IgE-Antikörper in einzelnen Seren

Serum Nr.	Allergene in <i>Cannabis</i> -Blattextrakt	Allergene in <i>Cannabis</i> -Blütenextrakt	Allergene im <i>Cannabis</i> -Samenextrakt
1	11 kDa	11 kDa	-
	17 kDa	17 kDa	17 kDa
	19 kDa	19 kDa	19 kDa
	31 kDa	31 kDa	31 kDa
	39 kDa	39 kDa	39 kDa
	-	43 kDa	-
	52 kDa	52 kDa	52 kDa
	98 kDa	98 kDa	98 kDa
2	-	31 kDa	-
	-	43 kDa	-
	-	52 kDa	-

3	- - - 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa	11 kDa 17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa	- 17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa
4	-	-	-
5	- 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa	19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa	- 31 kDa 39 kDa 52 kDa - -
6	- - 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa	17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa	- - 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa
7	- 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa	19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa	- 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa
8	- - 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa	17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa	- - 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa
9	- - - -	31 kDa 43 kDa 39 kDa 52 kDa	31 kDa - 39 kDa 52 kDa
10	-	-	-
11	- 31 kDa 39 kDa - 52 kDa 98 kDa	19 kDa 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa	- 31 kDa 39 kDa 43 kDa 52 kDa 98 kDa
12	11 kDa 17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa	11 kDa 17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa	- 17 kDa 19 kDa 31 kDa 39 kDa

	- 52 kDa 98 kDa	43 kDa 52 kDa 98 kDa	43 kDa 52 kDa 98 kDa
13	11 kDa	11 kDa	-
14	-	-	17 kDa
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	- - 52 kDa	31 kDa 43 kDa 52 kDa	31 kDa - -
19	-	-	-

Bei den Ergebnissen der IgE-IB-Untersuchungen mit den 19 Seren der Gruppen A-C wird deutlich (Tab. 15), dass die Seren atopischer Patienten (Gruppe A) im IB am häufigsten *Cannabis*-Allergene detektierten - im *Cannabis*-Blütenextrakt zu 83,3 %. Ein Probandenserum (20 %) der Kontrollgruppe C detektierte in allen drei Extrakten *Cannabis*-Allergene, am häufigsten im *Cannabis*-Blütenextrakt. Die anderen Kontrollseren detektierten nicht.

Tab. 15: Erkennung von Allergenen aus *Cannabis*-Blatt-, Blüten- und –Samenextrakten durch Seren der Gruppen A-C im IgE-Immunoblot

Gruppe	<i>Cannabis</i> -Blattextrakt n / %	<i>Cannabis</i> -Blütenextrakt n / %	<i>Cannabis</i> -Samenextrakt n / %
A (n = 12)	8 / 66,6	10 / 83,3	9 / 75,0
B (n = 2)	1 / 50	1 / 50	1 / 50
C (n = 5)	1 / 20	1 / 20	1 / 20
Gesamt (n = 19)	10 / 52,6	12 / 63,2	11 / 57,9

In *Cannabis*-Blatt-, Blüten- und Samenextrakten wurden 8 verschiedene Allergene hinsichtlich ihrer MG identifiziert (vgl. Tab. 16). Insofern sind also nur Seren berücksichtigt, die Allergene im IB visualisierten. Es zeigte sich, dass detektierte Allergene mit einem MG von 17 kDa, 19 kDa, 31 kDa, 39 kDa, 52 kDa und 98 kDa in allen drei *Cannabis*-Extrakten erkannt wurden und stark korrelierten. Antigene mit einem MG von 43 kDa wurden nur im *Cannabis*-Blüten- und -Samenextrakt detektiert. Ein Allergen mit 11 kDa wurde im *Cannabis*-Blütenextrakt von vier Seren visualisiert; das Protein von 6 kDa von keinem Serum.

Tab. 16: Muster der Allergenerkennung in *Cannabis*-Blatt-, Blüten- und -Samenextrakten im IgE-Immunoblot

MG	Anzahl der Seren, die im <i>Cannabis</i> - Blattextrakt detektierten n / %	Anzahl der Seren, die im <i>Cannabis</i> - Blütenextrakt detektierten n / %	Anzahl der Seren, die im <i>Cannabis</i> - Samenextrakt detektierten n / %
6 kDa	-	-	-
11 kDa	2 / 10,5	4 / 21,1	-
17 kDa	2 / 10,5	5 / 26,3	4 / 21,1
19 kDa	2 / 10,5	8 / 42,1	3 / 15,8
31 kDa	9 / 47,4	11 / 57,9	10 / 52,6
39 kDa	9 / 47,4	9 / 47,4	9 / 47,4
43 kDa	-	11 / 57,9	4 / 21,1
52 kDa	9 / 47,4	11 / 57,9	9 / 47,4
98 kDa	8 / 42,1	8 / 42,1	6 / 31,6

Im IB werden immobilisierte Allergene von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum erkannt. In 84,2 % der Untersuchungen stimmten die Ergebnisse des IB mit denen des CAP-FEIA qualitativ überein (siehe Tab. 17). Berücksichtigt sind Seren, in denen sich mit mindestens einer der beiden Methoden spezifische IgE-Antikörper nachweisen ließen.

Tab. 17: Kongruenz der Ergebnisse von IgE-Immunoblot und CAP-FEIA

Serum Nr.	<i>Cannabis</i> - Blatt extrakt		<i>Cannabis</i> - Blüten extrakt	
	IgE-IB	CAP-FEIA (CAP-Klasse)	IgE-IB	CAP-FEIA (CAP-Klasse)
1	++	3	++	3
2	-	2	++	2
3	++	2	++	2
4	-	1	-	0
5	++	1	++	1
6	++	2	++	3
7	++	3	++	3
8	++	2	++	2
9	+	2	++	2
10	-	0	-	0
11	++	2	++	3
12	++	2	++	3
13	+	4	++	5
14	-	2	-	2
15	-	0	-	0
16	-	1	-	1
17	-	1	-	0
18	++	0	++	0
19	-	1	-	0

++ = deutliche Bande(n), + = schwache Bande(n)

Alle Untersuchungsergebnisse über die Patientenseren sind im Anhang unter 8.2 (Tab. 32) einzeln aufgeführt.

5.5 Charakterisierung der Seren anhand spezifischer IgE-Antikörper gegen verbreitete Allergenträger

5.5.1 Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene aus *Cannabis*-Blättern

In 19 Seren (48,7 %) wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blättern gefunden (vgl. Tab. 18).

Tab. 18: Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene aus *Cannabis*-Blättern

CAP-Klasse	A (n = 12) n / %	B (n = 2) n / %	C (n = 5) n / %	D (n = 20) n / %	Gesamt (n = 39) n / %
O	1 / 8,3	-	2 / 40,0	17 / 85,0	20 / 51,3
1 oder 2	9 / 75,0	1 / 50,0	3 / 60,0	3 / 15,0	16 / 41,0
3 oder 4	2 / 16,7	1 / 50,0	-	-	3 / 7,7
> 4	-	-	-	-	-
positiv (≥ 1)	11 / 91,7	2 / 100,0	3 / 60,0	3 / 15,0	19 / 48,7

- kein Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum unter 0,35 kU/l

5.5.2 Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene aus *Cannabis*-Blüten

In 15 Seren (38,5 %) wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blüten gefunden (vgl. Tab. 19).

Tab. 19: Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene aus *Cannabis*-Blüten

CAP-Klasse	Gruppe				Gesamt (n = 39) n / %
	A (n = 12) n / %	B (n = 2) n / %	C (n = 5) n / %	D (n = 20) n / %	
O	2 / 16,7	-	4 / 80,0	18 / 90,0	24 / 61,5
1 oder 2	6 / 50,0	1 / 50,0	1 / 20,0	2 / 10,0	10 / 25,6
3 oder 4	4 / 33,3	-	-	-	4 / 10,3
> 4	-	1 / 50,0	-	-	1 / 2,6
positiv (≥ 1)	10 / 83,3	2 / 100,0	1 / 20,0	2 / 10,0	15 / 38,5

- kein Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum unter 0,35 kU/l

5.5.3 Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*

In 15 Seren (38,5 %) konnten spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Dermatophagoides pteronyssinus* nachgewiesen werden (vgl. Tab. 20).

Tab. 20: Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene von *Dermatophagoides pteronyssinus* im Serum

CAP-Klasse	Gruppe				Gesamt (n = 39) n / %
	A (n = 12) n / %	B (n = 2) n / %	C (n = 5) n / %	D (n = 20) n / %	
O	2 / 16,7	1 / 50,0	5 / 100,0	16 / 80,0	24 / 61,5
1 oder 2	3 / 25,0	1 / 50,0	-	1 / 5,0	5 / 12,8
3 oder 4	4 / 33,3	-	-	3 / 15,0	7 / 17,9
> 4	3 / 25,0	-	-	-	3 / 7,7
positiv (≥ 1)	10 / 83,3	1 / 50,0	-	4 / 20,0	15 / 38,5

- kein Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum unter 0,35 kU/l

5.5.4 Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene einer Mischung von Pollen frühblühender Gräser

In 15 Seren (38,5 %) konnten spezifische IgE-Antikörper gegen Pollen-Allergene einer Mischung frühblühender Gräser nachgewiesen werden (vgl. Tab. 21).

Tab. 21: Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene einer Mischung von Pollen frühblühender Gräser

CAP-Klasse	Gruppe				Gesamt (n = 39) n / %
	A (n = 12) n / %	B (n = 2) n / %	C (n = 5) n / %	D (n = 20) n / %	
O	3 / 25,0	2 / 100,0	5 / 100,0	14 / 70,0	24 / 61,5
1 oder 2	-	-	-	3 / 15,0	3 / 7,7
3 oder 4	9 / 75,0	-	-	3 / 15,0	12 / 30,8
> 4	-	-	-	-	-
positiv (≥ 1)	9 / 75,0	-	-	6 / 30,0	15 / 38,5

- kein Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum unter 0,35 kU/l

5.5.5 Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Pollenallergene der Birke

In 13 Seren (33,3 %) konnten spezifische IgE-Spiegel gegen Birkenpollenallergene nachgewiesen werden (vgl. Tab. 22).

Tab. 22: Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Birkenpollenallergene

CAP-Klasse	Gruppe				Gesamt (n = 39) n / %
	A (n = 12) n / %	B (n = 2) n / %	C (n = 5) n / %	D (n = 20) n / %	
O	3 / 25,0	1 / 50,0	5/100,0	17 / 85,0	26 / 66,7
1 oder 2	1 / 8,3	1 / 50,0	-	1 / 5,0	3 / 7,7
3 oder 4	5 / 41,7	-	-	2 / 10,0	7 / 17,9
> 4	3 / 25,0	-	-	-	3 / 7,7
positiv (≥ 1)	9 / 75,0	1 / 5,0	-	3 / 15,0	13 / 33,3

- kein Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern im Serum unter 0,35 kU/l

5.6 Korrelationen der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper im Serum gegen verbreitete Allergene

Signifikante Korrelationen der Messwerte für die Konzentrationen spezifischer Serum-IgE-Antikörper gegen unterschiedliche Allergene können Hinweise auf mögliche Kreuzreaktivitäten geben.

Die errechneten, theoretischen Abhängigkeiten können praktisch überprüft werden, indem Inhibitionstests (siehe 5.7) die mathematischen Zusammenhänge experimentell bestätigen oder widerlegen.

5.6.1 Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern bzw. –Blüten und von *Dermatophagoides pteronyssinus*

Zwischen den Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern bzw. –Blüten und solchen gegen die Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* ließen sich keine signifikanten Korrelationen erkennen. Der Korrelationskoeffizient spezifischer IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Antigene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* betrug $r = 0,223$, eine Signifikanz fand sich nicht ($p = 0,173$). Der Korrelationskoeffizient spezifischer IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blütenextrakt und gegen Antigene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* betrug $r = 0,303$, eine Signifikanz fand sich auch hier nicht ($p = 0,061$). Die graphischen Darstellungen der Korrelationen zeigen die Abbildungen 12-13.

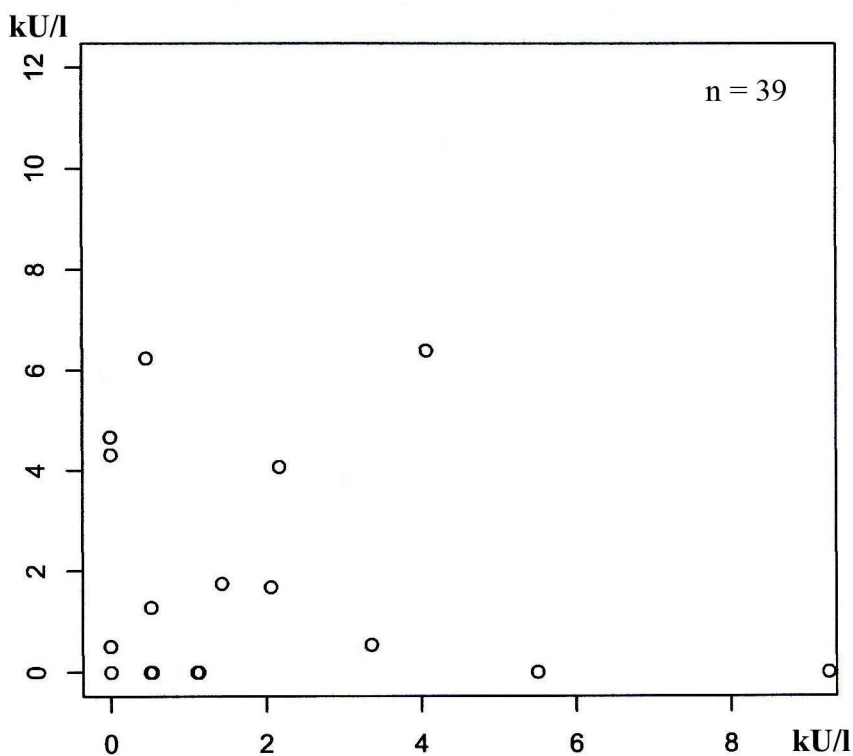


Abb. 12: Korrelationsmatrix der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Allergene von *Dermatophagoides pteronyssinus* ($r = 0,223$ und $p = 0,173$)

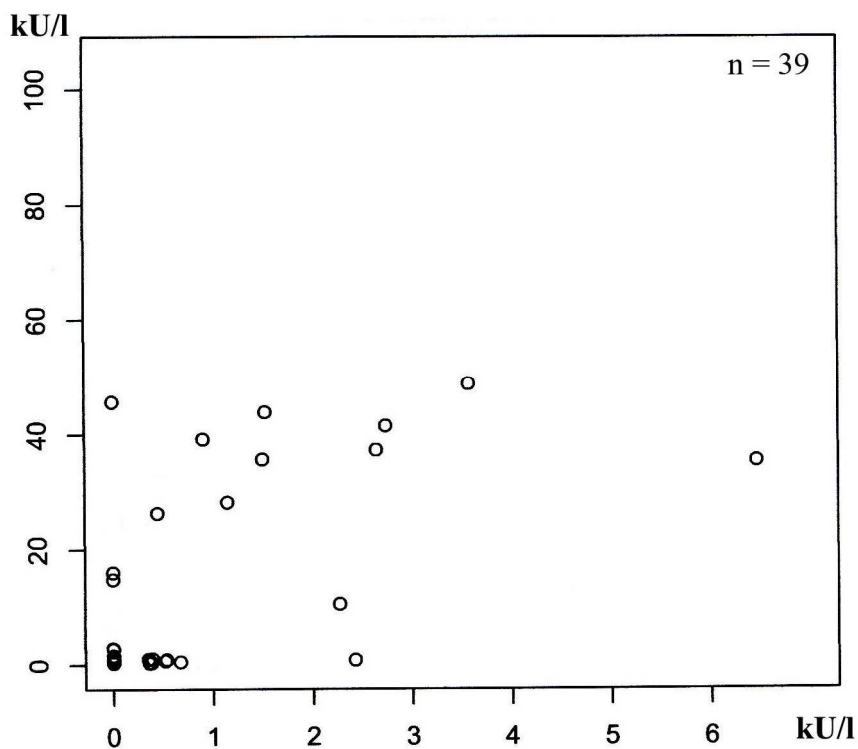


Abb. 14: Korrelationsmatrix der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene aus *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Allergene von Pollen frühblühender Gräser ($r = 0,544$ und $p = 0,000$)

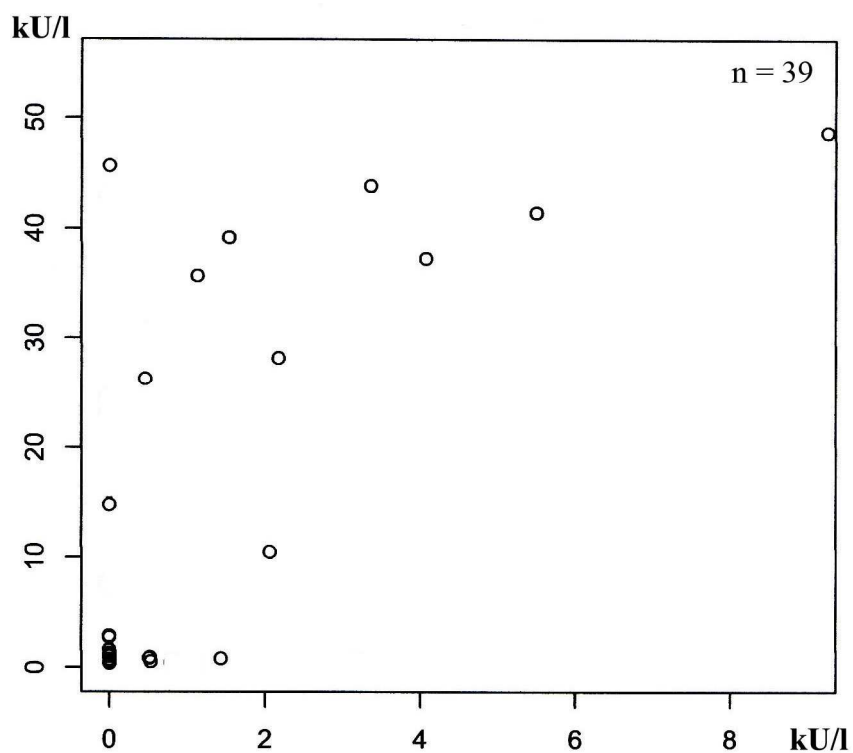


Abb. 15: Korrelationsmatrix der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene aus *Cannabis*-Blütenextrakt und gegen Allergene von Pollen frühblühender Gräser ($r = 0,601$ und $p = 0,000$)

5.6.3 Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern bzw. –Blüten und von Birkenpollen

Zwischen den Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern bzw. –Blüten und jenen gegen Birkenpollen ließen sich signifikante Korrelationen erkennen. Der Korrelationskoeffizient spezifischer IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Antigene von Birkenpollen betrug $r = 0,658$; das Ergebnis war statistisch signifikant ($p = 0,000$). Der Korrelationskoeffizient spezifischer IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blütenextrakt und gegen Antigene von Birkenpollen betrug $r = 0,736$; der Wert war ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,000$). Die graphischen Darstellungen der Korrelationen zeigen die Abbildungen 16-17.

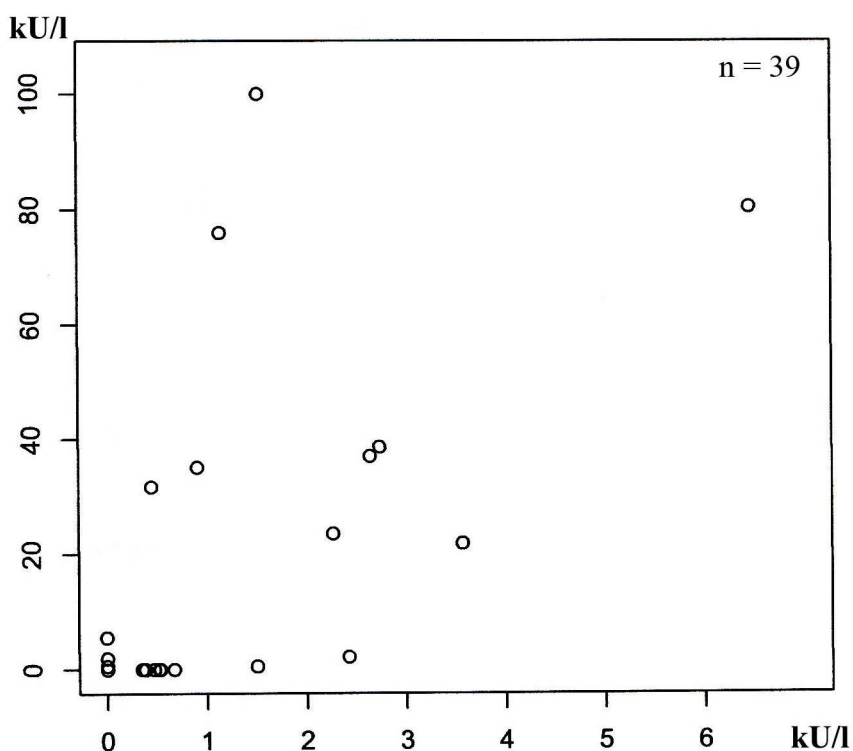


Abb. 16: Korrelationsmatrix der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Allergene von Birkenpollen ($r = 0,658$ und $p = 0,000$)

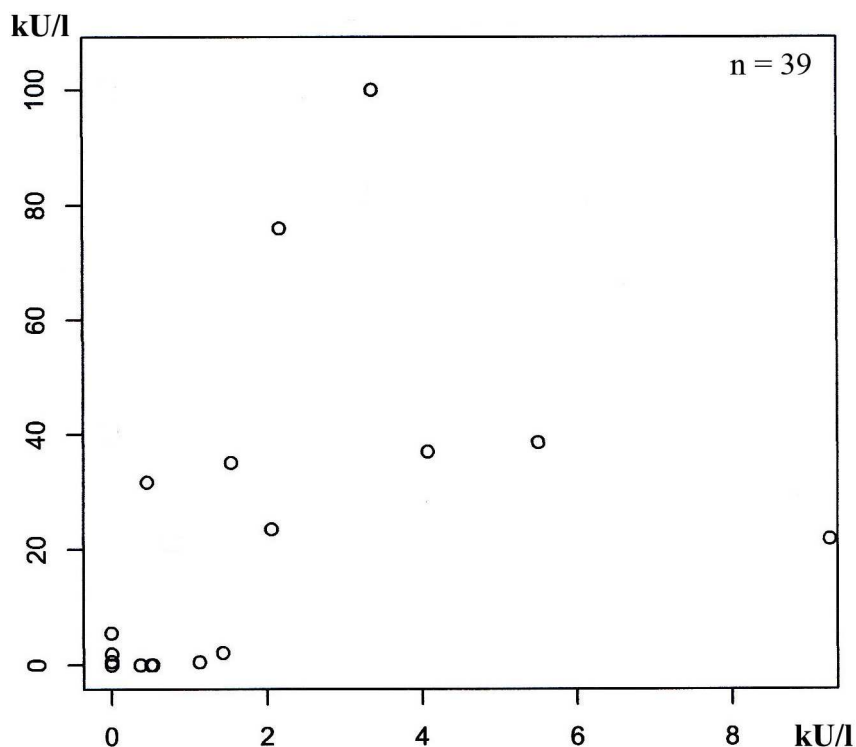


Abb. 17: Korrelationsmatrix der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blütenextrakt und gegen Allergene von Birkenpollen ($r = 0,736$ und $p = 0,000$)

5.6.4 Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern und –Blüten

Zwischen den Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern und solchen gegen *Cannabis*-Blüten ergab sich eine hoch signifikante Korrelation (vgl. Abb. 18).

Der Korrelationskoeffizient spezifischer IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Antigene aus *Cannabis*-Blütenextrakt betrug $r = 0,934$; das statistische Signifikanzniveau war deutlich ($p = 0,000$).

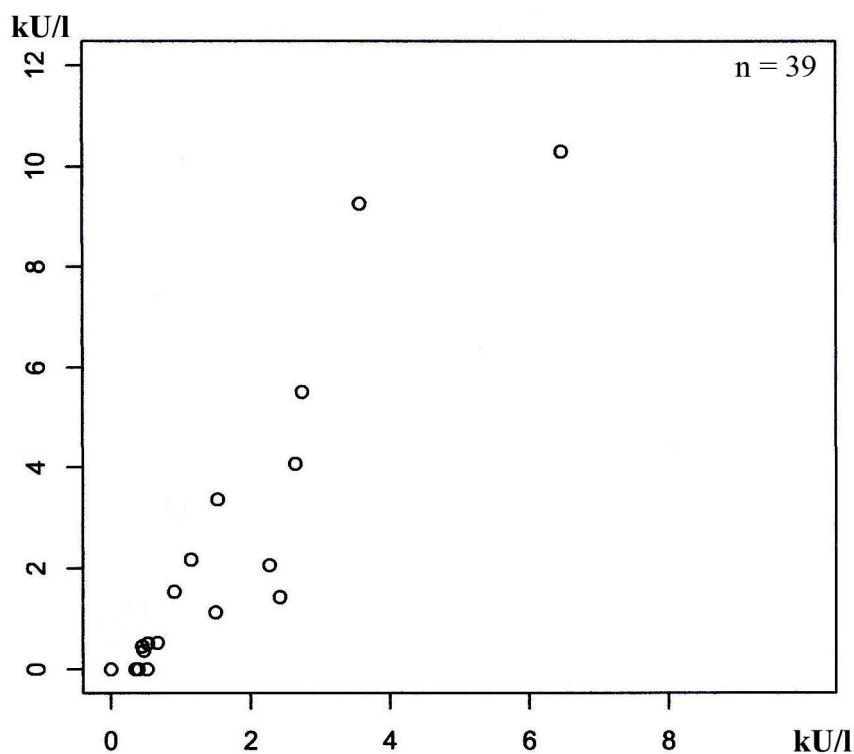


Abb. 18: Korrelationsmatrix der Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene aus *Cannabis*-Blattextrakt und gegen Allergene aus *Cannabis*-Blütenextrakt ($r = 0,934$ und $p = 0,000$)

5.7 Inhibitionstests

Die Inhibitionsexperimente dienten zur Identifizierung von Kreuzreaktionen zwischen Allergenen aus *Cannabis*-Blütenextrakt mit denjenigen aus Pollen frühblühender Gräser, aus Birkenpollen bzw. aus *Cannabis*-Samenextrakt. Es wurde dabei gemessen, ob die Vorinkubation des Serums mit Allergenen aus Gräser- bzw. Birkenpollen oder aus *Cannabis*-Samenextrakt die IgE-Bindung an *Cannabis*-Blütenantigene beeinflusste (hemmte).

Zur Beurteilung von Inhibitionsexperimenten sind zwei Bezugsgrößen wesentlich: Zum einen der CAP-Basiswert als Reaktion der nicht-inhibierten Serumprobe in Pufferlösung mit den festphasengebundenen Allergenen. Zum anderen die Autoinhibition durch die in flüssiger Form zugesetzten Allergene, die den festphasengebundenen entsprechen. Das ist sozusagen die Qualitätskontrolle.

Für die CAP-Inhibitionsversuche wurden die Patientenseren Nr. 1 und Nr. 7 (Gruppe A) und Nr. 13 (Gruppe B) ausgewählt.

Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 zeigten im CAP-FEIA sehr hohe Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen Allergene von Gräserpollen (jeweils CAP-Klasse 4), von Birkenpollen (CAP-Klasse 5 bzw. 4) und von *Cannabis*-Blüten (jeweils CAP-Klasse 3). Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 detektierten weiterhin im IB nahezu alle Allergene im *Cannabis*-Blütenextrakt.

Das Serum Nr. 13 zeigte im CAP-FEIA sehr hohe Konzentrationen ausschließlich für spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern und -Blüten (CAP-Klasse 4 bzw. 5) und detektierte im IB nur ein Protein der Molekülmasse 11 kDa. Spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* als auch gegen diejenigen von Gräser- und Birkenpollen waren im CAP-FEIA nicht zu finden (jeweils CAP-Klasse 0).

5.7.1 Inhibition des Gräserpollen-CAP durch *Cannabis*-Blütenallergene

Mit Patientenserum Nr. 1 ergab sich bei der Untersuchung der Eigenhemmung in der höchsten Konzentrationsstufe des Gräserpollenextraktes und damit im unverdünnten Inhibitionsansatz eine unvollständige Hemmung von 38,90 %. Eine Hemmung durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt gelang nicht. Einzelheiten sind in Abbildung 19 dargestellt.

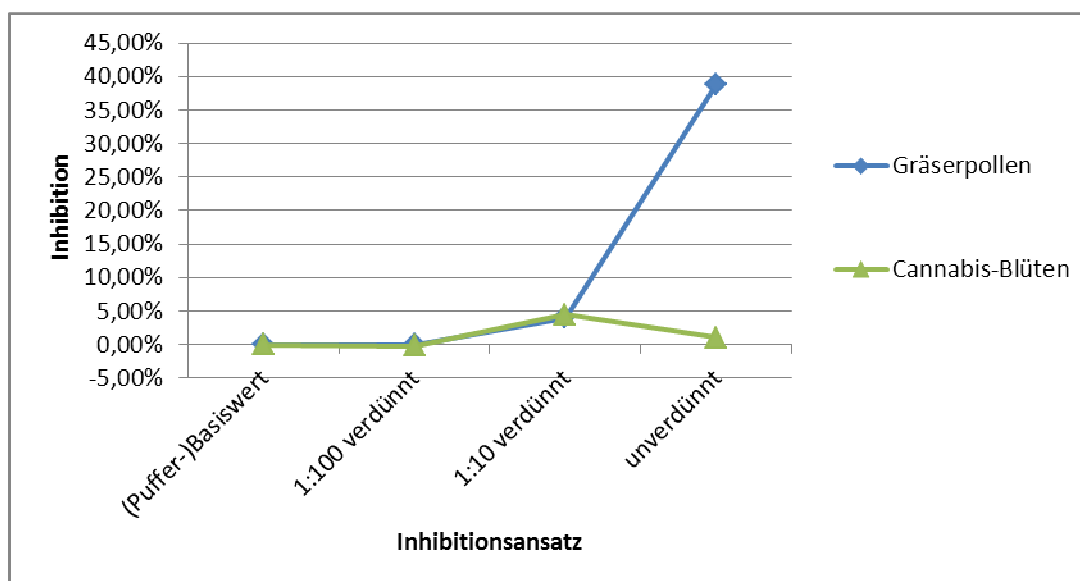


Abb. 19: Inhibition des Gräserpollen-CAP durch Gräserpollen- und *Cannabis*-Blütenextrakt (Patientenserum Nr. 1; spezifisches IgE gegen Gräserpollen 35,4 kU/l)

Mit Patientenserum Nr. 7 ergab sich bei der Untersuchung der Autoinhibition in der höchsten Konzentrationsstufe des Gräserpollenextraktes und damit in unverdünntem Inhibitionsansatz keine Hemmung. Eine Hemmung durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt war nicht erkennbar. Einzelheiten siehe Abbildung 20.

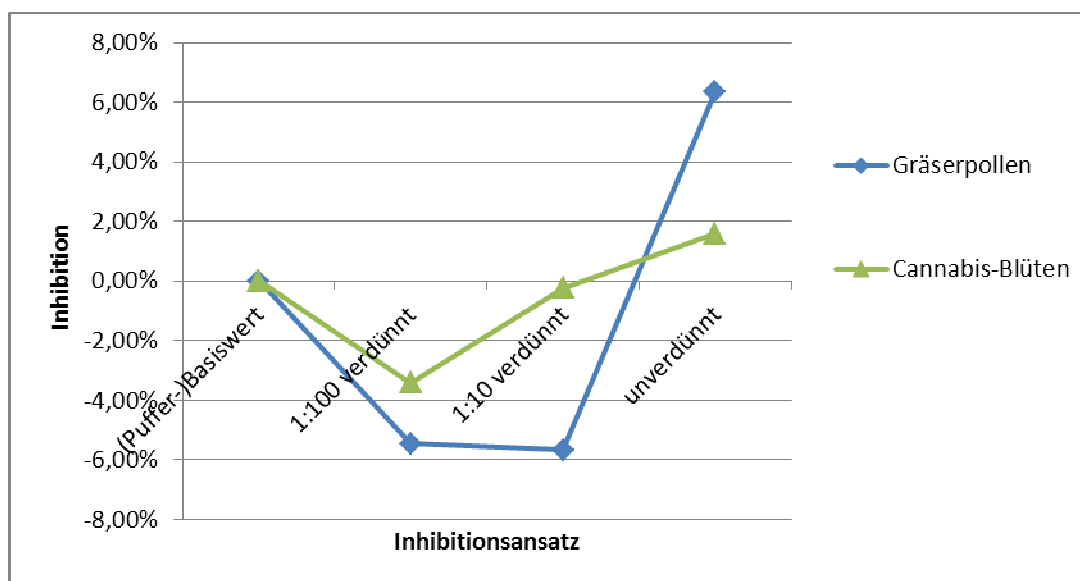


Abb. 20: Inhibition des Gräserpollen-CAP durch Gräserpollen- und *Cannabis*-Blütenextrakt (Patientenserum Nr. 7; spezifisches IgE gegen Gräserpollen 48,8 kU/l)

5.7.2. Inhibition des Birkenpollen-CAP durch *Cannabis*-Blütenallergene

Mit Patientenserum Nr. 1 ergab sich bei der Untersuchung der Eigenhemmung mit Birkenpollenextrakt in der mittleren Konzentrationsstufe und damit in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine unvollständige Hemmung (72,83 %), in der höchsten Konzentrationsstufe des Birkenpollenextraktes und damit in unverdünntem Inhibitionsansatz eine nahezu komplette Hemmung (96,07 %). Eine Hemmung durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt war nicht zu erreichen. Einzelheiten sind in Abbildung 21 dargestellt.

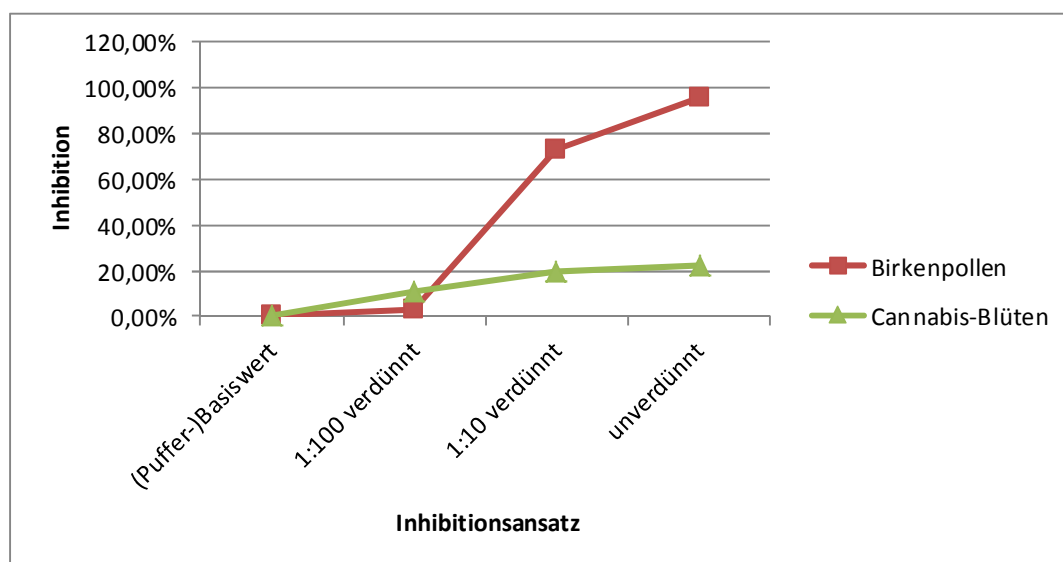


Abb. 21: Inhibition des Birkenpollen-CAP durch Birkenpollen- und *Cannabis*-Blütenextrakt (Patientenserum Nr. 1; spezifisches IgE gegen Birkenpollen 80,4 kU/l)

Mit Patientenserum Nr. 7 ergab sich bei der Untersuchung der Selbstinhibition mit Birkenpollenextrakt in der mittleren Konzentrationsstufe und damit in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine unvollständige Hemmung (40,67 %), in der höchsten Konzentrationsstufe des Birkenpollenextraktes und damit in unverdünntem Inhibitionsansatz eine fast vollständige Hemmung (85,37 %). Eine Hemmung durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt war nicht zu erkennen. Einzelheiten sind der Abbildung 22 zu entnehmen.

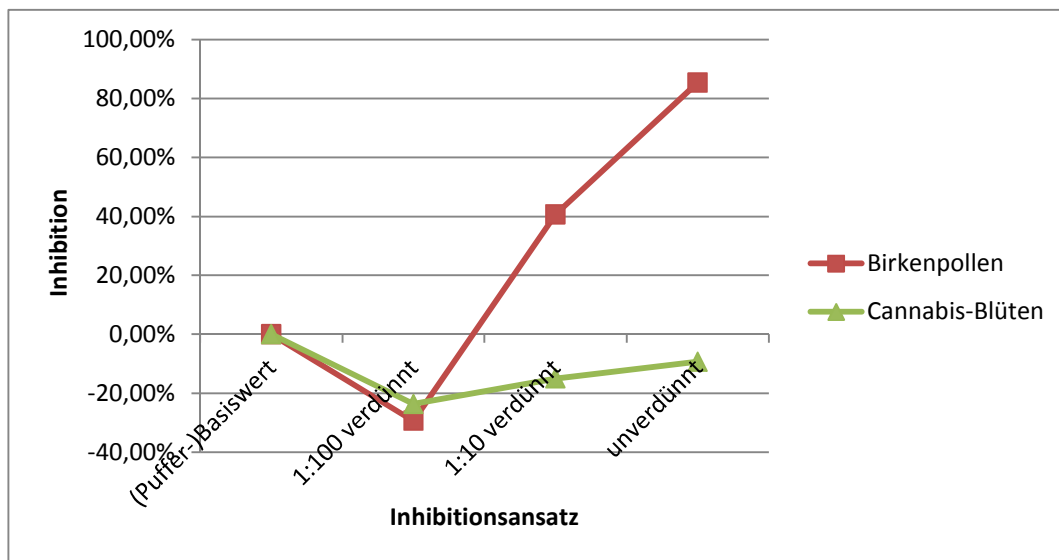


Abb. 22: Inhibition des Birkenpollen-CAP durch Birkenpollen- und *Cannabis*-Blütenextrakt (Patientenserum Nr. 7; spezifisches IgE gegen Birkenpollen 21,8 kU/l)

5.7.3 Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen- oder Birkenpollen-allergene

Mit Patientenserum Nr. 1 ergab sich bei der Untersuchung der Eigenhemmung in der niedrigsten Konzentrationsstufe des *Cannabis*-Blütenextraktes und damit in der höchsten Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine partielle Hemmung (67,97 %), in der mittleren sowie höchsten Konzentrationsstufe des *Cannabis*-Blütenextraktes (im mittleren verdünnten sowie im unverdünnten Inhibitionsansatz) eine fast vollständige Hemmung (jeweils 86,72 %). Eine Hemmung durch Vorinkubation mit Gräserpollenextrakt war nicht zu erkennen. Eine Vorinkubation mit Birkenpollenextrakt ergab in der mittleren Konzentration des Birkenpollenextraktes und damit in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine partielle Hemmung (53,12 %), in der höchsten Konzentration des Birkenpollenextraktes und damit im unverdünnten Inhibitionsansatz eine nahezu vollständige Hemmung (86,72 %). Einzelheiten zeigt die Abbildung 23.

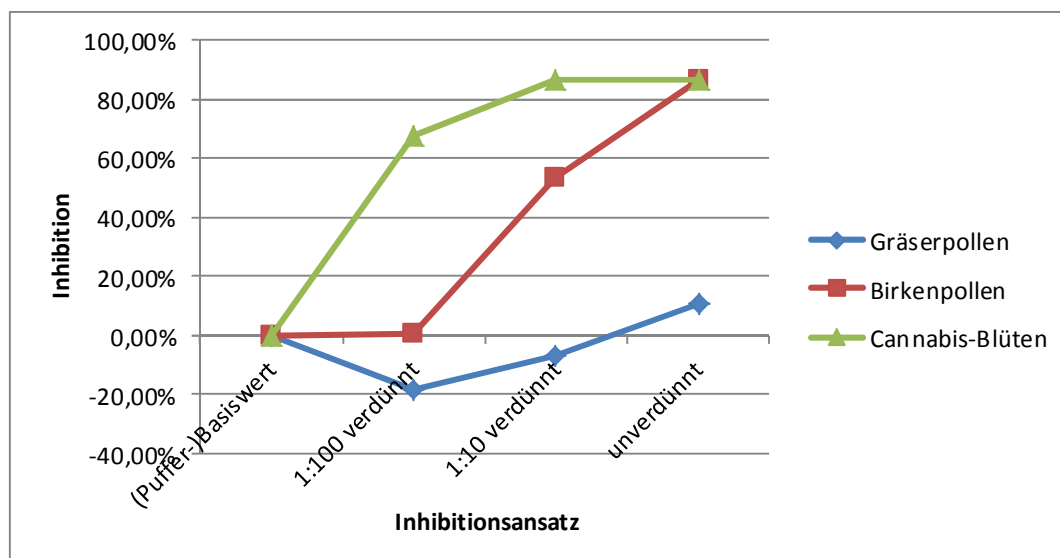


Abb. 23: Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen-, Birkenpollen- oder *Cannabis*-Blütenextrakt
(Patientenserum Nr. 1; spezifisches IgE gegen *Cannabis*-Blüten 10,3 kU/l)

Mit Patientenserum Nr. 7 ergab sich bei der Untersuchung der Selbstinhibition in der niedrigsten Konzentration des *Cannabis*-Blütenextraktes und damit in der höchsten Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine partielle Hemmung (68,12 %), mit der mittleren und höchsten Konzentration des *Cannabis*-Blütenextraktes (in mittlerem und unverdünntem Inhibitionsansatz) eine fast vollständige Hemmung (jeweils 92,58 %). Weder eine Hemmung durch Vorinkubation mit Gräserpollenextrakt noch mit Birkenpollenextrakt war möglich. Einzelheiten zeigt die Abbildung 24.

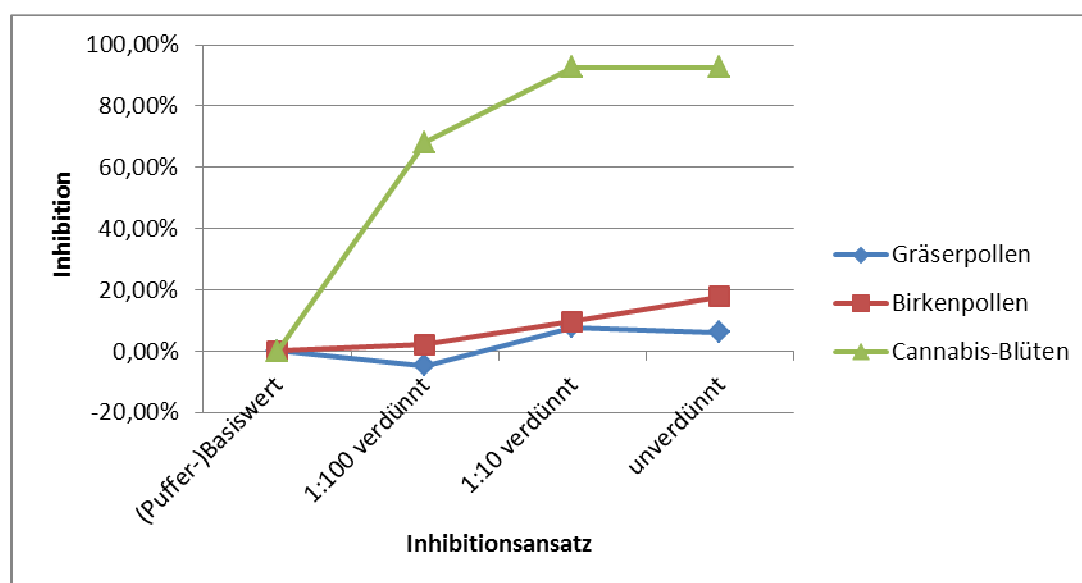


Abb. 24: Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen-, Birkenpollen- oder *Cannabis*-Blütenextrakt
(Patientenserum Nr. 7; spezifisches IgE gegen *Cannabis*-Blüten 9,3 kU/l)

5.7.4 Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen- oder Birkenpollen- oder *Cannabis*-Samenallergene

Mit Patientenserum Nr. 13 ergab sich bei der Untersuchung der autologen Inhibition mit der niedrigsten Konzentration des *Cannabis*-Blütenextraktes und damit in der höchsten Verdünnungsstufe des Inhibitionsansatzes eine partielle Hemmung (56,02 %), mit der mittleren und höchsten Konzentration des *Cannabis*-Blütenextraktes (in mittlerem verdünntem sowie in unverdünntem Inhibitionsansatz) eine nahezu komplette Hemmung (97,39 % bzw. 99,25 %). Die Vorinkubation sowohl mit Gräserpollenextrakt als auch mit Birkenpollenextrakt ergab keine Hemmung. Durch Vorinkubation mit der mittleren Konzentration von *Cannabis*-Samenextrakt (in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes) konnte eine geringe Hemmung erreicht werden (40,71 %), durch Vorinkubation mit der höchsten Konzentration des *Cannabis*-Samenextraktes (im unverdünnten Inhibitionsansatz) eine partielle Hemmung (57,88 %). Einzelheiten der Ergebnisse sind der Abbildung 25 zu entnehmen.

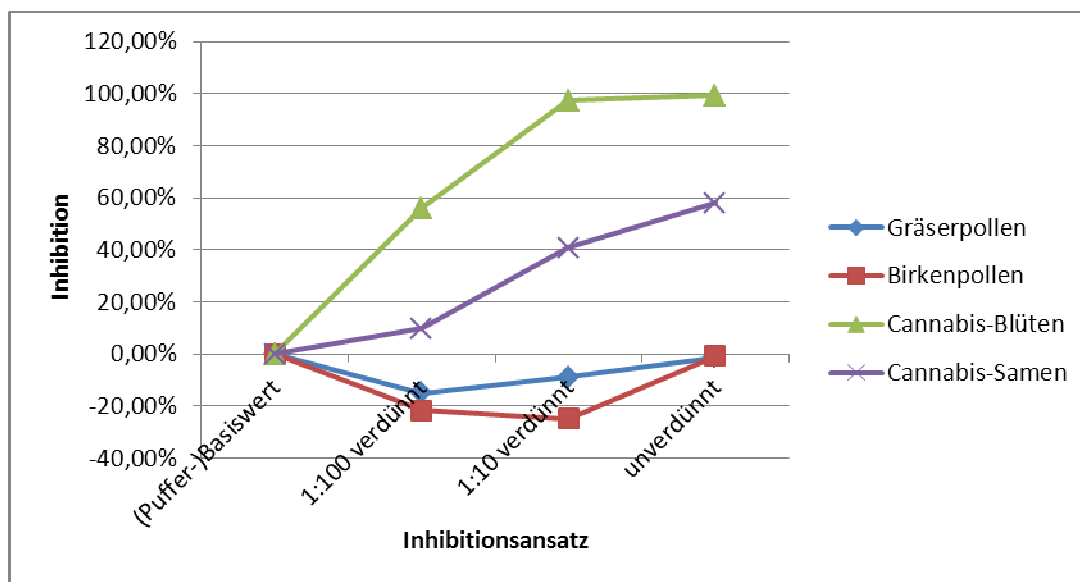


Abb. 25: Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen-, Birkenpollen-, *Cannabis*-Blüten- oder *Cannabis*-Samenextrakt (Patientenserum Nr. 13; spezifisches IgE gegen *Cannabis*-Blüten 60,8 kU/l)

6. Diskussion

6.1 Sensibilisierung und Allergie durch *Cannabis*: Was ist bisher bekannt?

Allergische Erkrankungen sind schon aus dem Altertum bekannt und entsprechende Reaktionen werden bereits in der antiken medizinischen Literatur beschrieben. Besonders häufig manifestieren sich Allergien am Hautorgan und an den Atemwegen [208]. Als Folge können Erkrankungen wie allergische Rhinitis, Asthma bronchiale oder Anaphylaxie auftreten [209]. Allergische Erkrankungen in der Gesamtbevölkerung haben in den letzten Jahrzehnten zugenommen [210]. Soforttypreaktionen unter Beteiligung von Immunglobulinen (Ig) der Klasse E sind klassische Allergien. Bei den Allergenen handelt es sich im Allgemeinen um Proteine oder Glycoproteine [211].

In der vorliegenden Studie wurde die IgE-vermittelte Sensibilisierung durch *Cannabis*-Blätter, -Blüten und -Samen untersucht. Erste konkrete wissenschaftliche Hinweise, dass *Cannabis* und daraus gewonnene Produkte die Ursache von allergischen Reaktionen sein können, stammen aus dem Jahr 1971 und wurden von LISKOW publiziert [11]. Er berichtete von einer 29-jährigen Patientin, die nach dem erstmaligen Rauchen einer Marihuana-Zigarette einen anaphylaktischen Schock erlitt. Dass es sich um eine immunologische Reaktion handelte, bestätigten ein Hautpricktest sowie ein passiver Transfertest. Weitere Dokumentationen von allergischen Reaktionen auf *Cannabis* folgten. Dabei wurde am häufigsten auf Allergien durch Inhalation eingegangen [212].

Aber auch oral zugeführte *Cannabis*-Samen können allergische Reaktionen induzieren. So berichtete STADTMAUER [213] 2003 von einem 44-jährigen Patienten, der in seiner Vergangenheit regelmäßig Marihuana rauchte und nach dem erstmaligen Verzehr von gerösteten *Cannabis*-Samen Juckreiz in den Augen, Urtikaria am ganzen Körper sowie Atembeschwerden entwickelte und schließlich einen anaphylaktischen Schock erlitt. Wahrscheinlich kam es beim Rauchen durch die Inhalation von *Cannabis*-Allergenen zu einer Sensibilisierung gegen diese.

LEWIS [214] beschrieb 1975 bei atopischen Personen allergische Reaktionen nach dem Rauchen von Marihuana, konnte aber keine Zusammenhänge mit positiven Hautpricktests aus rohem *Cannabis*-Extrakt feststellen. Umgekehrt beobachtete FREEMAN [215] 1983 bei 70 %

seiner Patienten einen positiven Pricktest mit *Cannabis*-Pollen. Die Personen hatten sich vermutlich durch *Cannabis*-Pollen, der in Arizona und im Westen Neu Mexikos weit verbreitet ist, sensibilisiert. Im Jahr 2000 konnte STOKES [216] beweisen, dass ein positiver Pricktest gegen *Cannabis*-Pollen mit allergischen Symptomen wie Rhinitis und Asthma eng korreliert.

2006 berichtete MAJMUDAR [217] über eine 29-jährige atopische kriminaltechnische Angestellte, die seit sechs Jahren beruflich mit *Cannabis* zu tun hatte. Anfänglich zeigte sie keine Symptome, reagierte jedoch nach zwei Jahren sofort nach *Cannabis*-Kontakt mit Beschwerden wie Rhinitis und Urtikaria. Ein Hautpricktest mit *Cannabis*-Blättern und -Blüten sowie mit Haschisch verlief positiv. Die Patientin wurde beschwerdefrei, nachdem sie einen Arbeitsplatz zugewiesen bekam, an dem sie die Nähe zu *Cannabis*-Pflanzen meiden konnte. Von ähnlichen Beobachtungen berichtete auch WILLIAMS 2008 [218]. Eine 29-jährige Kriminalbeamtin, die seit zwei Jahren mit *Cannabis* zu tun hatte, zeigte seit drei Monaten Urtikaria-Symptome am Unterarm - wenige Minuten nach dem jeweiligen Kontakt mit der Pflanze. Ein Hautpricktest mit *Cannabis*-Blättern und vor allem mit -Blüten war positiv. Bereits 1980 begann LINDEMAYR [219] bei einem nicht atopischen 26-jährigen Kriminaltechniker, der nach berufsbedingtem *Cannabis*-Kontakt Urtikaria-Symptome an Händen und Unterarmen sowie Rhinitis und Konjunktivitis entwickelte und bei einem Reibtest mit *Cannabis*-Pollen angereichertem Haschisch eine ausgeprägte Reaktion zeigte, eine Hyposensibilisierung mit Hopfenextrakten. Es wurde Hopfen verwendet – eine Pflanze aus der Familie der Hanfgewächse (*Cannabaceae*) –, da *Cannabis*-Antigene nicht verfügbar waren.

Wiederholte Fälle von Byssinose an Textilarbeitern eines *Cannabis*-verarbeitenden Betriebes bestätigten ZUSKIN und FISHWICK, wobei die Ursache für die Auslösung der Staublungie unklar blieb. ZUSKIN [220] beobachtete 1994 eine hohe Prävalenz akuter und chronischer respiratorischer Symptome und eine niedrige ventilatorische Kapazität durch die Messung des maximalen expiratorischen Flussvolumens (MEFV), der forcierten Vitalkapazität (FVC) und des maximalen Minutenvolumens (MVV). FISHWICK [221] zeigte 2001 Lungenveränderungen anhand von Messungen des maximalen Minutenvolumens (MVV) sowie veränderte Zelloberflächenmarker und Antikörper im Blut von Hanfarbeitern, die mit den berufsbedingten respiratorischen Symptomen zusammenhingen.

VIDAL [222] wies 1991 spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Samen im Serum eines 51-jährigen Lebensmittelhändlers nach, der unter Asthma-Attacken nach Kontakt mit *Cannabis*-Samen litt. Der Nachweis erfolgte *in vivo* mittels Haut- und Bronchial-Provokationstests und *in vitro* anhand von Enzymimmunoassays und Histaminfreisetzung aus Basophilen.

Von HERZINGER [223] wurden mittels CAP-FEIA die Seren von zwei Mitarbeitern eines forensischen Instituts auf spezifische IgE-Antikörper gegen Marihuana oder Haschisch untersucht. Die zwei Patienten (weiblich, 52 Jahre alt und männlich, 49 Jahre alt) wiesen allergische Beschwerden (nasale Kongestion, Rhinitis, Niesen, asthmatische Symptome) nach Kontakt mit Marihuana oder Haschisch auf – ohne weitere atopische Erkrankungen. Bei beiden Patienten wurden spezifische IgE-Antikörper (CAP-Klasse 2) gegen Marihuana gemessen.

ANIBARRO [224] beobachtete 1996 an einem 22-jährigen atopischen Patienten mit Rhinokonjunktivitis nach *Cannabis*-Exposition einen positiven Hautpricktest mit wässrigem *Cannabis*-Extrakt. Dies ließ eine IgE-vermittelte Reaktion wasserlöslicher *Cannabis*-Bestandteile vermuten. Auf eine allergische Reaktion lässt auch der Fallbericht von PEREZ [225] aus dem Jahr 2000 über einen 25-jährigen Mann schließen, der 45 Minuten nach intravenöser Injektion eines selbst zubereiteten wässrigen *Cannabis*-Extraktes mit Symptomen wie Gesichtssödem, Juckreiz und Atembeschwerden ins Krankenhaus eingeliefert wurde.

KAGEN [226] untersuchte 1983, ob die Kontamination mit Pilzsporen (*Aspergillus*), die auf Marihuana isoliert wurden, einen Einfluss auf den klinischen Status und auf Immunantworten von Marihuana-Rauchern haben kann. Der Autor kam zu dem Schluss, dass Marihuana-Sorten Infektionserreger aufweisen, die das Risiko einer Sensibilisierung gegen *Aspergillus*-Sporen erhöhen und indirekt als Ursache von Lungenentzündung und von Aspergillose angesehen werden können, was von weiteren Autoren bestätigt wurde [227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234]. Die Ausbildung von Erkrankungen, die durch Inhalation von lebensfähigen Pilzsporen ausgelöst werden, hängen primär von der angeborenen Immunität ab. Eine Störung des Metabolismus polymorphkerniger Zellen, die für die Immunität von herausragender Bedeutung sind, bei gleichzeitiger Inhalation von Pilzsporen kann zur Entwicklung invasiver Mykosen führen.

6.2 Aufbereitung des Materials

Die wasserlöslichen Proteine aus *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen wurden durch einfache Inkubation zerkleinerter Pflanzenteile in TCM-Puffer extrahiert. Diese einfache Extraktionsmethode findet auch in der Literatur Anwendung [235]. Für die Extraktion membrangebundener Proteine sind auch klassische Extraktionsmethoden mit Trichloressigsäure und anschließender Acetonpräzipitation beschrieben [236].

Dem von mir verwendeten Pflanzenmaterial wurde von Prof. HEUBL vom Botanischen Institut der LMU München mikrobielle Reinheit attestiert, weshalb eine mögliche Kontamination durch Pilzsporen oder Fremdpollen keine Rolle spielte und vernachlässigt wurde.

6.3 Spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*

Zur Bestimmung der spezifischen IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blatt- und -Blütenantigene wurde das CAP-FEIA-System verwendet. Dafür wurden biotinylierte *Cannabis*-Proteine an mit Streptavidin-aktivierte Celluloseschwämmchen gebunden und dann wie üblich zur Bestimmung der Konzentration spezifischer IgE-Antikörper im CAP-FEIA-System eingesetzt. In 19 Seren (48,7 %) wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blattextrakt und in 15 Seren (38,5 %) spezifische IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blütenextrakt ermittelt.

Aufgeteilt nach den Gruppen ergab sich folgendes Bild: In Gruppe A (atopische Patienten, kein wissentlicher *Cannabis*-Kontakt) wiesen 91,7 % der Seren spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blätter auf und 83,3 % der Seren spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blüten. In den beiden Seren der Patienten der Gruppe B (sensibilisiert, vorheriger bekannter *Cannabis*-Kontakt) wurden spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blätter und -Blüten gefunden (100 %). In Gruppe C (nicht atopisch, kein wissentlicher *Cannabis*-Kontakt) war der prozentuale Anteil von Probanden mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen *Cannabis*-Blätter bzw. -Blüten mit 60 % bzw. 20 % relativ hoch. Das Patientenkollektiv der Gruppe D (Drogenkonsumenten mit wahrscheinlichem *Cannabis*-Kontakt) war am wenigsten

gegen *Cannabis* sensibilisiert; 15,0 % der Seren hatten spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blätter und 10,0 % der Seren spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blüten.

Die Patientenseren in Gruppe A, die spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blätter und -Blüten enthielten, lassen Kreuzreaktionen von IgE-Antikörpern gegen Atopieallergene von z.B. Gräser- und Birkenpollen mit *Cannabis*-Allergenen vermuten. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse der CAP-Inhibitionsexperimente (siehe Abschnitt 5.7) untermauert. ARMENTIA et al. [252] kamen 2011 zu dem Ergebnis, dass eine Gräserpollenallergie nicht mit einer Sensibilisierung gegen *Cannabis* korrelierte. Kontakt mit Tomaten- und vor allem Tabakallergenen wurde dagegen mit einer Sensibilisierung gegen *Cannabis* assoziiert. Auch LARRAMENDI [246] zeigte mittels IB-Inhibitionsexperimenten Kreuzreaktionen zwischen Allergenen aus *Cannabis*-Blatt- und Tomatenextrakten. Dagegen handelt es sich bei den spezifischen IgE-Antikörpern in den Seren der beiden Patienten aus Gruppe B tatsächlich um spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Antigene. Die Seren aus Gruppe C, die spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Allergene enthielten, stammten von nicht-atopischen Personen ohne vorherigen wesentlichen *Cannabis*-Kontakt. Diese Seren konnten kaum spezifische IgE-Antikörper gegen Gräserpollen-, Birkenpollen- und *Cannabis*-Allergene besitzen. Die Ergebnisse der Seren aus Gruppe D überraschen nicht, da Rauschgiftkonsumenten in der Regel nicht an *Cannabis* sterben, sondern an härteren Drogen wie Heroin, Kokain oder an verschiedenen Produkten gleichzeitig.

6.4 Charakterisierung der *Cannabis*-Allergene

Die Auftrennung der Proteine aus wässrigen Extrakten von *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen erfolgte mittels SDS-PAGE. Die silbergefärbten Extrakte zeigten konkordante Bandenmuster sowohl im niederen als auch mittleren und höheren MG-Spektrum. In allen Extrakten waren übereinstimmende und intensive Proteinbanden bei 11 kDa, 19 kDa, 31 kDa, 39 kDa, 52 kDa und 98 kDa erkennbar. In den *Cannabis*-Blüten- und -Samenextrakten wurde zusätzlich eine schwache Bande bei 43 kDa detektiert. Im MG-Bereich über 98 kDa waren in allen Extrakten diffuse Banden zu sehen. Die CBB-Färbung zeigte ein vergleichbares, wenn auch nicht so deutliches Bild. Hier wurden im *Cannabis*-Blütenextrakt eine zusätzliche schwache Bande bei 6 kDa sowie eine diffuse Bande bei 17 kDa visualisiert. In der Literatur

sind *Cannabis*-Proteine mit ähnlichen Molekülmassen beschrieben. TANAKA [237] detektierte 1998 in *Cannabis*-Pollen distinkte Banden der Größe 10 kDa, 14 kDa, 20 kDa, 45 kDa, 60 kDa und 68 kDa. Die Proteinbanden bei 10 kDa, 20 kDa, 45 kDa und 60 kDa könnten mit den Banden in den vorliegenden Untersuchungen korrelieren. Auch LARRAMENDI [238] identifizierte 2008 mehrere distinkte Proteinbanden in *Cannabis*-Blattextrakten im Bereich zwischen 9 kDa und 98 kDa, wobei die Proteinbanden bei 9 kDa, 21 kDa, 31 kDa und 98 kDa mit den Banden in der vorliegenden Studie übereinstimmen könnten. LARRAMENDI [238] geht davon aus, dass die Proteinbande bei 14 kDa Profilinen und die Proteinbande bei 31 kDa Pektinesterasen entspricht.

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteinextrakte wurden im Westernblot auf eine NC-Membran transferiert und immungefärbt. Die Blotstreifen wurden mit Seren von 14 atopischen Patienten (12 Seren mit einem Gesamt-IgE-Gehalt von >200 kU/l und 2 Seren von Probanden mit privater bzw. beruflicher *Cannabis*-Exposition) sowie mit Seren von 5 nicht-sensibilisierten Kontrollpersonen inkubiert. Am häufigsten wurden in *Cannabis*-Blatt-, -Blüten- und -Samenextrakten Allergene mit der molekularen Masse von 19 kDa, 31 kDa, 39 kDa, 43 kDa, 52 kDa und 98 kDa detektiert. Ein Allergen mit 11 kDa wurde im *Cannabis*-Blütenextrakt von 3 Seren visualisiert, und das Allergen mit 17 kDa, das nur in der CBB-Färbung erkennbar war, im *Cannabis*-Blütenextrakt von 5 Seren. Das Protein mit 6 kDa, das sich ebenfalls nur in der CBB-Färbung zeigte, konnte im IB nicht nachgewiesen werden. Mit 10 der verwendeten 12 Seren atopischer Patienten konnten *Cannabis*-Allergene im IB detektiert werden, wobei diese hauptsächlich Molekülmassen über 11 kDa aufwiesen.

Die Seren Nr. 4 und Nr. 10 aus der Gruppe A der atopischen Patienten wiesen im CAP-FEIA keine spezifischen IgE-Antikörper gegen Allergene von Gräserpollen und Birkenpollen (jeweils CAP-Klasse 0) auf, wohl aber sehr hohe spezifische IgE-Antikörper-Spiegel gegen Antigene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* (CAP-Klasse 6 bzw. 4). Die Versuche mit den Seren Nr. 4 und Nr. 10 können als zusätzliche Kontrollansätze interpretiert werden, in denen spezifische IgE-Antikörper im IB keine *Cannabis*-Allergene erkennen konnten, da die Allergenstrukturen der Hausstaubmilbe mit denen der pflanzlichen *Cannabis*-Blätter und -Blüten wohl wenig verwandt sind. Die statistische Auswertung bestätigte die fehlende Korrelation zwischen Allergenen der Hausstaubmilbe und denen der *Cannabis*-Extrakte (siehe 5.6.1). Vernachlässigt man also die beiden nicht detektierenden Seren Nr. 4 und Nr. 10, so haben alle Seren atopischer Patienten aus Gruppe A, die spezifische IgE-

Antikörper gegen Gräser- oder Birkenpollen enthielten, *Cannabis*-Allergene im IB erkannt (vgl. Tabelle 20).

Interessanterweise konnte mit der Serum der Patientin Nr. 14 (aus Gruppe B), die seit einiger Zeit allergische Reaktionen nach Kontakt mit *Cannabis*-Pflanzen zeigte, im IB nur ein Allergen von 17 kDa im *Cannabis*-Samenextrakt identifiziert werden, obwohl im CAP-FEIA spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blätter und –Blüten jeweils der CAP-Klasse 2 nachgewiesen wurden. Möglicherweise enthält das Serum dieser Patientin vorwiegend spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Pollenallergene, und bei den im CAP-FEIA detektierten spezifischen IgE-Antikörpern war es zu Kreuzreaktionen mit Majorallergenen gekommen. Beim Antigen von 17 kDa könnte es sich um das Majorallergen Bet v 1 (MG 17 kDa) des Birkenpollens handeln [239, 240], für dessen Visualisierung der Gehalt an spezifischen IgE-Antikörpern im Serum Nr. 14 ausreichte. Im CAP-FEIA wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Birkenpollen, gegen *Cannabis*-Blätter und –Blüten jeweils in der CAP-Klasse 2 nachgewiesen. Das Serum der Patientin Nr. 14 zeigte den vergleichsweise niedrigsten Gesamt-IgE-Gehalt (169,0 kU/l) aller Seren unter den atopischen Patienten. Auch können die Unterschiede in der IgE-Bindung im CAP-FEIA und im IB dadurch erklärt werden, dass sich die Raumstrukturen der Allergene durch die Trockenfixierung im IB veränderten und von den spezifischen IgE-Antikörpern nicht mehr erkannt wurden.

Wie bereits in anderen Forschungen publiziert, zeigten auch die IB-Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass *Cannabis* verschiedene IgE-bindende Allergene enthält. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurden von LARRAMENDI [238] in *Cannabis*-Blattextrakten die stärksten Allergenbanden bei 9 kDa und 14 kDa visualisiert, weniger stark bei 31 kDa und 35 kDa. LARRAMENDI verwendete die Seren von Patienten, die gegen Tomaten und/oder *Cannabis* sensibilisiert waren. TANAKA [237] identifizierte aus *Cannabis*-Pollen mittels IB und dem Serum eines atopischen Patienten im Massenspektrographen zwei Allergene mit den MG von 10,050 kDa und 13,706 kDa (neben 20 kDa, 45 kDa, 60 kDa und 68 kDa). Das erstgenannte Allergen könnte mit dem ebenfalls in der vorliegenden Studie detektierten 11 kDa-Allergen übereinstimmen. Beim zweitgenannten Allergen vermutete TANAKA [237] ein pollenspezifisches Allergen, z.B. ein Profilin. Die Allergenbanden von 20 kDa, 45 kDa und 60 kDa sind mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung vergleichbar. Ebenfalls aus *Cannabis*-Pollen wurde von MAYORAL 2008 [241] ein Allergen mit 37 kDa sowie ein weiteres mit 70-80 kDa im IB identifiziert. Dafür

wurde das Serum einer 27-jährigen Patientin, die mit nasalen Symptomen auf *Cannabis*-Pollen reagierte, verwendet. STADTMAUER [213] detektierte 2003 mit dem Serum eines 44-jährigen Marihuana-Rauchers zwei *Cannabis*-Samenallergene mit dem MG von 6 kDa und 11 kDa. Der Patient entwickelte beim erstmaligen Verzehr einer mit *Cannabis*-Samen zubereiteten Speise Urtikaria-Symptome an verschiedenen Körperstellen, Gesichtssödeme, Atembeschwerden und schließlich einen anaphylaktischen Schock. In Auszügen von PAJARON [241] und MORALES [242] wird 2005 bzw. 2006 ebenfalls von zwei *Cannabis*-Allergenen mit einem MG von 35 kDa und von 40 kDa berichtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie im IB (mit *Cannabis*-Blatt-, -Blüten- oder -Samenextrakt) sind den detektierten Allergenen in IB-Untersuchungen (mit *Cannabis*-Blatt-, -Samen- oder -Pollenextrakten) der genannten Autoren gegenübergestellt (siehe Tab. 23). Dabei wird deutlich, dass die in der vorliegenden Studie ausgewählten Seren atopischer Patienten (Gruppe A und B) mit ihren spezifischen IgE-Antikörpern in vergleichbarer Weise die von anderen Autoren gefundenen *Cannabis*-Antigene bis auf drei (6 kDa, 14 kDa und 68-80 kDa) identifizierten. Ein 6 kDa-Protein konnte hier nach SDS-PAGE zwar angefärbt, aber nicht im IB detektiert werden. Beim 14 kDa-Protein könnte es sich um Panallergene aus der Familie der Profiline handeln, beim 68-80-kDa-Protein um ein pollenspezifisches Protein - *Cannabis*-Pollen wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Tab. 23: Detektierte IgE-bindende *Cannabis*-Allergene

Ergebnisse					
Vorliegende Studie	LARRAMENDI [238]	PAJARON [242] und MORALES [243]	STADTMAUER [213]	TANAKA [237]	MAJORAL [241]
<i>Cannabis</i> -Blatt-, Blüten- oder -Samenextrakt	<i>Cannabis</i> -Blattextrakt	<i>Cannabis</i> -Blattextrakt	<i>Cannabis</i> -Samenextrakt	<i>Cannabis</i> -Pollenextrakt	<i>Cannabis</i> -Pollenextrakt
98 kDa	98 kDa	-	-	-	-
-	-	-	-	68 kDa	70-80 kDa
52 kDa	-	-	-	60 kDa	-
43 kDa	-	40 kDa	-	45 kDa	-
39 kDa	35 kDa	35 kDa	-	-	37 kDa
31 kDa	31 kDa	-	-	-	-
19 kDa	21 kDa	-	-	20 kDa	-
17 kDa	-	-	-	-	-
-	14 kDa	-	-	14 kDa	-
11 kDa	9 kDa	-	11 kDa	10 kDa	-
6 kDa	-	-	6 kDa	-	-

Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche wurden durch die statistische Auswertung der erhobenen Daten in Streudiagrammen bestätigt. So korrelierten spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Allergene von Birkenpollen ($r = 0,560$) und spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blüten mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Allergene von Birkenpollen ($r = 0,649$) signifikant ($p = 0,000$). Geringere Korrelationen zeigten spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blättern mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Allergene von Gräserpollen verschiedener Frühblüher ($r = 0,397$) und spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blüten mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Allergene von Gräserpollen verschiedener Frühblüher ($r = 0,376$). Die höchste Korrelation (Signifikanzniveau $p = 0,000$) bestand zwischen spezifischen IgE-Antikörpern gegen Antigene von *Cannabis*-Blättern mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Antigene von *Cannabis*-Blüten ($r = 0,875$), was sich in einer Linearität in der Korrelationsmatrix ausdrückte. Zwischen spezifischen IgE-Antikörpern gegen *Cannabis*-Allergene mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Allergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* ergaben sich keine signifikanten Korrelationen ($r = 0,194$ bzw. $r = 0,213$), weshalb mit Hausstaubmilbenallergenen auf Inhibitionsversuche verzichtet wurde.

6.5 Kreuzreaktionen zwischen *Cannabis*-Allergenen und Allergenen von Gräser- bzw. Birkenpollen

Cannabis-Allergene wurden in verschiedenen Studien von IgE-Antikörpern aus den Seren atopischer Personen, die nach eigenem Wissen nie mit *Cannabis* in Berührung kamen, erkannt. Dies ließ auf Kreuzreaktionen schließen. LARRAMENDI [238] zeigte mittels IB-Inhibitionsexperimenten Kreuzreaktionen zwischen Allergenen aus *Cannabis*-Blatt- und Tomatenextrakten. Dafür wurden die Seren von 32 Patienten verwendet, die gegen Tomaten- und/oder *Cannabis*-Allergene sensibilisiert waren, was sich durch respiratorische und kutane Symptome äußerte. Die Inhibierung der *Cannabis*-Allergene durch Tomatenantigene war nahezu vollständig. Die Autoren spekulierten, dass insbesondere vier *Cannabis*-Allergene mit den MG 9 kDa, 14 kDa, 31 kDa und 35 kDa verwandt sind mit Antigenen aus Tomaten und anderen Früchten. Diese Proteine könnten mit Lipidtransferproteinen (LTP), Profilinen, Pektinesterasen und Polygalactonurase übereinstimmen. Auch ARMENTIA et al. [244]

konnten 2011 zeigen, dass Patienten, die bereits gegen Tomaten- und vor allem Tabakallergene sensibilisiert waren, mit höherer Wahrscheinlichkeit mit einer Sensibilisierung gegen *Cannabis* reagierten. Eine Gräserpollenallergie war dagegen nicht assoziiert mit einer Sensibilisierung gegen *Cannabis*. Die Autoren zeigten dies anhand von Hautpricktests und der Messung des spezifischen IgE-Spiegels im Serum atopischer Patienten, die allergisch gegen Pollen reagierten oder gegen Tabak, Tomate oder Latex sensibilisiert waren oder *Cannabis* konsumierten.

In der vorliegenden Studie wurden CAP-Inhibitionstests mit Extrakten aus *Cannabis*-Blüten und –Samen sowie vorgefertigten Allergenträgern mit Gräser- und Birkenpollen durchgeführt, um mögliche Kreuzreaktionen von *Cannabis*-spezifischen IgE-Antikörpern mit Allergenen von Gräser- und Birkenpollen abzuklären. Obwohl die *Cannabis*-Blattextrakte (390 µg/ml) einen geringfügig höheren Proteingehalt als die *Cannabis*-Blütenextrakte (318 µg/ml) aufwiesen, wurden letztere für die Biotinylierung verwendet, da im IB in *Cannabis*-Blütenextrakten mehr distinkte Banden detektiert wurden, was für einen höheren Gehalt an unterschiedlichen Allergenen in den *Cannabis*-Blütenextrakten sprach.

Für die Untersuchungen zur CAP-Inhibition wurden die Patientenserum Nr. 1, Nr. 7 und Nr. 13 verwendet. Die beiden Seren Nr. 1 und Nr. 7 (Gruppe A) wurden ausgewählt, da sie die höchsten gemessenen Werte für spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blüten aufwiesen und im IB *Cannabis*-Allergene in fast allen Molekülmassen detektierten. Im Serum Nr. 13 wurde ein sehr hoher Wert für spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blütenallergene ermittelt, jedoch wurden keine spezifischen IgE-Antikörper gegen Gräser- und Birkenpollenantigene gemessen. So waren mit Serum Nr. 13 keine Kreuzreaktionen von Gräser- und Birkenpollen-spezifischen IgE-Antikörpern auf Allergene von *Cannabis* zu erwarten.

Patient Nr. 1 gehörte zur Gruppe A der atopischen Patienten, ohne wesentliche *Cannabis*-Exposition in der Vergangenheit. Das Patientenserum Nr. 1 wies einen Gesamt-IgE-Spiegel von 851,0 kU/l und hohe CAP-Werte für Gräserpollen (CAP-Klasse 4; Konz. 35,4 kU/l), für Birkenpollen (CAP-Klasse 5; Konz. 80,4 kU/l) sowie für *Cannabis*-Blüten (CAP-Klasse 3; Konz. 10,3 kU/l) auf. Im IB wurden *Cannabis*-Allergene im gesamten Größenspektrum von 11 kDa bis 98 kDa detektiert.

Mit Patientenserum Nr. 1 war die Eigeninhibition des Gräserpollen-CAP unvollständig (38,89 %), die Autoinhibition sowohl des Birkenpollen- als auch des *Cannabis*-Blüten-CAP jeweils fast vollständig. Es wurde eine partielle Eigeninhibition (72,83 %) durch Birkenpollenallergene in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes und eine nahezu komplette Selbstinhibition (96,07 %) in unverdünntem Inhibitionsansatz beobachtet. Mit *Cannabis*-Blütenallergenen konnte in der höchsten Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine partielle Autoinhibition (67,87 %) und in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine fast vollständige Eigeninhibition (86,72 %) erreicht werden.

Weder der Gräserpollen-CAP konnte durch Vorinkubation des Patientenserums Nr. 1 mit *Cannabis*-Blütenextrakt inhibiert werden, noch der *Cannabis*-Blüten-CAP durch Vorinkubation mit Gräserpollenextrakt. Die Inhibition des Birkenpollen-CAP durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt war gering (21,92 % bei unverdünntem Inhibitionsansatz). Dagegen war die Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Vorinkubation mit Birkenpollenextrakt bei einer mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes partiell (53,12 %) und bei unverdünntem Inhibitionsansatz nahezu vollständig (86,72 %).

Aufgrund der fehlenden *Cannabis*-Exposition in der Vergangenheit ließen diese Daten darauf schließen, dass spezifische IgE-Antikörper gegen Birkenpollenallergene *Cannabis*-Blütenallergene erkannten und mit diesen kreuzreagieren konnten. Diese Reaktion galt nicht für spezifische IgE-Antikörper gegen Gräserpollenallergene und *Cannabis*-Blütenallergene. Dieses Ergebnis stimmte mit der Studie von ARMENTIA et al. [244] überein, die 2011 zeigten, dass eine Gräserpollenallergie mit einer Sensibilisierung gegen *Cannabis* nicht assoziiert war. Auch die effizientere Inhibierung des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Birkenpollenantigene – im Vergleich zum umgekehrten Fall (Inhibierung des Birkenpollen-CAP durch *Cannabis*-Blütenallergene) - ließ vermuten, dass die Mehrzahl der IgE-Antikörper im Serum Nr. 1 spezifisch gegen Birkenpollenallergene gerichtet war und von diesen mit hoher Affinität gebunden wurden, jedoch mit einer niedrigeren Affinität unspezifisch *Cannabis*-Blütenallergene erkannten und binden konnten. Auch bei den im CAP-FEIA detektierten IgE-Antikörpern gegen *Cannabis*-Blütenallergene handelte es sich somit wahrscheinlich um spezifische IgE-Antikörper gegen Birkenpollenallergene.

Auch Patient Nr. 7 gehörte zur Gruppe A der atopischen Patienten ohne wissentliche *Cannabis*-Exposition in der Vergangenheit. Das Patientenserum Nr. 7 wies einen Gesamt-IgE-Spiegel von 698,0 kU/l und hohe CAP-Werte für Gräserpollen (CAP-Klasse 4; Konz. 48,8 kU/l), Birkenpollen (CAP-Klasse 4; Konz. 21,8 kU/l) und *Cannabis*-Blüten (CAP-Klasse 3; Konz. 9,3 kU/l) auf. Im IB wurden *Cannabis*-Allergene im Größenspektrum von 19 kDa bis 98 kDa detektiert.

In Übereinstimmung mit dem Patientenserum Nr. 1 war die Eigeninhibition des Gräserpollen-CAP mit Patientenserum Nr. 7 nicht möglich, die Autoinhibition des Birkenpollen-CAP und des *Cannabis*-Blüten-CAP war jeweils vollständig. Für Birkenpollenallergene wurde eine fast vollständige Eigeninhibition (85,37 %) in unverdünntem Inhibitionsansatz beobachtet. Mit *Cannabis*-Blütenallergenen konnte in der höchsten Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine partielle (68,12 %) und in unverdünntem Inhibitionsansatz eine nahezu komplette Eigeninhibition (92,58 %) erreicht werden.

Nicht inhibiert wurden sowohl der Gräserpollen-CAP durch Vorinkubation des Patientensersums Nr. 7 mit *Cannabis*-Blütenextrakt als auch der *Cannabis*-Blüten-CAP durch Vorinkubation mit Gräserpollenextrakt. Ebenso konnte der Birkenpollen-CAP durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt als auch der *Cannabis*-Blüten-CAP durch Vorinkubation mit Birkenpollenextrakt nicht gehemmt werden.

Aus der fehlenden *Cannabis*-Exposition in der Vergangenheit konnte vermutet werden, dass spezifische IgE-Antikörper gegen Birkenpollen, jedoch nicht gegen Gräserpollen im Serum des Patienten Nr. 7 *Cannabis*-Allergene erkannten und somit kreuzreagierten. Die im Gegensatz zu Patientenserum Nr. 1 fehlende Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Vorinkubation mit Birkenpollenallergenen ließ jedoch auf eine niedrigere Kreuzreaktivität schließen. Dies könnte an der (im Vergleich zu Patientenserum Nr. 1) vierfach niedrigeren Konzentration der spezifischen Birkenpollen-IgE-Antikörper (im Patientenserum Nr. 7) gelegen haben.

Patient Nr. 13 gehörte zur Gruppe B der sensibilisierten Patienten mit *Cannabis*-Exposition in der Vergangenheit. Das Serum dieses Patienten wies einen Gesamt-IgE-Spiegel von 266,0 kU/l auf. Die CAP-Werte für spezifische IgE-Antikörper gegen Gräserpollen und gegen Birkenpollen waren jeweils Null, die CAP-Werte für spezifische IgE-Antikörper gegen

Cannabis-Allergene sehr hoch (*Cannabis*-Blätter CAP-Klasse 4; Konz. 31,8 kU/l, *Cannabis*-Blüten CAP-Klasse 5; Konz. 60,8 kU/l). Im IB wurde lediglich das niedermolekulare *Cannabis*-Allergen von 11 kDa detektiert.

In Übereinstimmung mit den Patientenseren Nr. 1 und Nr. 7 war die Eigeninhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP nahezu komplett. Es wurde bereits in der höchsten Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine partielle Autoinhibition (56,02 %) und in der mittleren Verdünnung des Inhibitionsansatzes eine nahezu vollständige Selbstinhibition (97,39 %) beobachtet. Durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Samenextrakt in unverdünntem Inhibitionsansatz wurde eine partielle Inhibition (57,88 %) des *Cannabis*-Blüten-CAP erzielt. Eine Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP sowohl durch Birkenpollen- als auch durch Gräserpollenallergene war nicht möglich.

Im Gegensatz zu den Patientenseren Nr. 1 und Nr. 7 ließen sich die spezifischen IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Allergene im Serum des Patienten Nr. 13 nicht durch Birkenpollenantigene inhibieren. Dass im IB lediglich ein niedermolekulares *Cannabis*-Allergen der Größe 11 kDa detektiert wurde, lässt vermuten, dass die im Serum enthaltenen spezifischen *Cannabis*-IgE-Antikörper lediglich kurzkettige Allergene erkannten. Patient Nr. 13 war erklärmaßen *Cannabis*-Raucher und kam wohl vor allem mit kurzkettigen *Cannabis*-Proteinen in Berührung: Da beim Rauchen einer Zigarette Temperaturen bis zu 950°C entstehen, werden die höhermolekularen Proteine hitzedenaturiert [141].

Insgesamt ist aufgrund der Ergebnisse, die mit den Seren der Patienten Nr. 1 und Nr. 7 erhalten wurden, davon auszugehen, dass zwischen *Cannabis*-Allergenen und typischen Atopieallergenen – vor allem Birkenpollenallergenen – eine Kreuzreaktivität besteht.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass *Cannabis* und *Cannabis*-Produkte allergen wirken können – auch dadurch, dass spezifische IgE-Antikörper vor allem gegen Birkenpollenallergene mit *Cannabis*-Allergenen kreuzreagieren. *Cannabis sativa* kann also als legales Narkotikum als auch als Nahrungsmittel oder illegales Rauschgift allergische Reaktionen vom Soforttyp auslösen.

7. Zusammenfassung

Allergische Erkrankungen wie allergische Rhinitis, Asthma bronchiale oder Anaphylaxie haben in der Gesamtbevölkerung in den letzten Jahrzehnten zugenommen. Soforttypreaktionen, ausgelöst durch Immunglobulin (Ig) der Klasse E, sind klassische Allergien. Erste konkrete wissenschaftliche Hinweise, dass *Cannabis* und daraus gewonnene Produkte die Ursache von allergischen Reaktionen sein können, stammen aus dem Jahr 1971.

Cannabis gehört zu den „weichen Drogen“ und wird weltweit konsumiert. Der psychoaktive *Cannabis*-Wirkstoff 9-Tetrahydrocannabinol (THC) wirkt analgetisch und euphorisierend. THC-arme Pflanzensorten werden inzwischen als industrieller Rohstoff z.B. zur Produktion von Nahrungsmitteln oder von Kleidung eingesetzt. Während die Toxikologie von *Cannabis* recht gut untersucht ist, ist nur wenig über dessen immunologische und allergologische Wirkung bekannt. Es wird vermutet, dass das Rauchen von *Cannabis* zu einer IgE-vermittelten Sensibilisierung führen kann, die sich u.a. in allergischem Schnupfen oder Asthma äußert. Auch das allergene Potenzial von THC-armem Industriehanf ist noch nicht ausreichend geklärt. Für einen breiteren Einsatz von legalen *Cannabis*-Produkten ist die Untersuchung der allergenen Potenz von *Cannabis* für den Endverbraucher als auch für Personen, die in der Erzeugung und Verarbeitung von *Cannabis* beschäftigt sind, sehr wichtig.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob *Cannabis* eine IgE-vermittelte Sensibilisierung induzieren kann. Dafür wurden *Cannabis*-Allergene aus Proteinextrakten von *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen unter Verwendung von 39 ausgewählten Patientenseren charakterisiert: 12 Seren von atopischen Patienten mit Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (Heuschnupfen oder Asthma bronchiale oder atopisches Ekzem) oder positivem Hautpricktest (auf Katzenepithelien oder Hausstaubmilben oder Gräserpollen) ohne bekannten *Cannabis*-Kontakt (Gruppe A), 2 Seren von Personen mit privater oder beruflicher *Cannabis*-Exposition und Allergiesymptomen in Gegenwart von *Cannabis* (Gruppe B), 5 Seren von nicht atopischen Probanden ohne bekannten *Cannabis*-Kontakt (Gruppe C) und 20 Seren von verstorbenen Personen, denen im Rahmen von Drogenkontrollen *Cannabis*-Konsum nachgewiesen wurde (Gruppe D).

Zur Charakterisierung der *Cannabis*-Antigene wurden extrahierte *Cannabis*-Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und dann silbergefärbt bzw. mit einem Westernblot auf eine NC-Membran transferiert und anschließend mit den Patientenseren zum Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern inkubiert. Mittels CAP-FEIA-System wurde in allen 39 Seren die Konzentration spezifischer IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blatt- sowie -Blütenextrakt ermittelt. CAP-Inhibitionstests dienten der Untersuchung möglicher Kreuzreaktionen von *Cannabis*-spezifischen IgE-Antikörpern mit Allergenen von Gräser- und Birkenpollen. Dafür wurden 2 Patientenseren der Gruppe A sowie ein Serum der Gruppe B – als Negativkontrolle für Kreuzreaktionen – ausgewählt.

In den Extrakten von *Cannabis*-Blättern, -Blüten und -Samen waren übereinstimmende und intensive Proteinbanden bei 11 kDa, 19 kDa, 31 kDa, 52 kDa und 98 kDa erkennbar. Im *Cannabis*-Blüten- und -Samenextrakt war zusätzlich eine schwache Bande bei 43 kDa zu sehen.

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteinextrakte wurden im Westernblot mit Seren von 14 atopischen Patienten (aus den Gruppen A und B) sowie mit Seren von 5 nicht-atopischen Personen (aus Gruppe C) inkubiert. Mit 11 der verwendeten 14 Seren (78,6 %) atopischer Patienten konnten *Cannabis*-Allergene im Immunoblot visualisiert werden. Ein Probandenserum der Gruppe C detektierte in allen drei Extrakten *Cannabis*-Allergene, am häufigsten im *Cannabis*-Blütenextrakt. Die anderen Kontrollseren detektierten nicht. Am häufigsten wurden im *Cannabis*-Blatt-, -Blüten- und -Samenextrakt Allergene mit der molekularen Masse von 19 kDa, 31 kDa, 39 kDa, 43 kDa, 52 kDa und 98 kDa erkannt.

In 19 Seren (insgesamt 48,7 %) wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blattextrakt gefunden. Die gemessenen Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen diese Allergene lagen zwischen 0,0 kU/l (CAP-Klasse 0) und 31,8 kU/l (CAP-Klasse 4). In 15 Seren (insgesamt 38,5 %) wurden spezifische IgE-Antikörper gegen Antigene aus *Cannabis*-Blütenextrakt gefunden. Die gemessenen Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen jene Allergene lagen zwischen 0,0 kU/l (CAP-Klasse 0) und 60,8 kU/l (CAP-Klasse 5).

Für die CAP-Inhibitionstests wurden zwei Seren atopischer Patienten (Gruppe A) mit jeweils der CAP-Klasse 3 für spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene von *Cannabis*-Blüten sowie ein Patientenserum (Gruppe B) mit der CAP-Klasse 5 für spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Blütenallergene, aber ohne spezifische IgE-Antikörper gegen Gräser- und Birkenpollenantigene, eingesetzt. Mit den beiden Seren atopischer Patienten (Gruppe A) konnte weder der Gräserpollen-CAP durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt inhibiert werden, noch der *Cannabis*-Blüten-CAP durch Vorinkubation mit Gräserpollenextrakt. Die Inhibition des Birkenpollen-CAP durch Vorinkubation mit *Cannabis*-Blütenextrakt war jeweils gering ausgeprägt. Die Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP war bei einem Serum durch Vorinkubation mit Birkenpollenextrakt nahezu vollständig, beim anderen Serum nicht möglich. Mit dem Serum des Patienten aus Gruppe B war eine Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Birkenpollen- und Gräserpollenallergene nicht möglich. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass zwischen *Cannabis*- und Birkenpollenallergenen Kreuzreaktionen bestehen können, aber auch nicht kreuzreaktive spezifische IgE-Antikörper gegen *Cannabis*-Allergene gebildet werden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass Proteine in *Cannabis* eine IgE-vermittelte Sensibilisierung auslösen und somit zu allergischen Soforttypreaktionen führen können. Dies ist beim Umgang mit *Cannabis*-Produkten zu beachten. Die klinische Bedeutung einer IgE-vermittelten Sensibilisierung gegen *Cannabis* ist durch weitere Studien zu klären.

8. Anhang

8.1 Methoden

8.1.1 Testkits und Reagenzien

Alablot	Biermann Bad Nauheim
Allergenträger (CAP-FEIA)	Phadia Freiburg
Antioxidans	Invitrogen Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Braun Melsungen
Biotin Labeling Kit (für Proteine)	Roche Mannheim
Blockierungsreagenz (für Proteine)	Roche Mannheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich München
Coomassie Brilliant Blue (CBB)	Serva Heidelberg
Essigsäure (96%)	Merck Darmstadt
Ethanol absolut	Merck Darmstadt
Glycerin	Merck Darmstadt
Laufpuffer	Invitrogen Karlsruhe
Laufpuffer Antioxidans	Invitrogen Karlsruhe
Probenpuffer	Invitrogen Karlsruhe
Methanol absolut	Merck Darmstadt
Multi Mark Standard-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich München
NuPAGE Bis-Tris-Gels	Invitrogen Karlsruhe
Phosphatgepufferte Lösung (PBS)	Roche Mannheim
Reduzierendes Agens	Invitrogen Karlsruhe
Rinderserumalbumin-Stammlösung (BSA)	Sigma-Aldrich München
Silberkit	Plusone Pharma Biotech
Silver Staining Kit Protein	Pharmacia Biotech Freiburg
SimplyBlue™ Safe Stain	Invitrogen Karlsruhe
Streptavidin-aktivierte Celluloseschwämmchen	Phadia Freiburg
Transferpuffer	Invitrogen Karlsruhe
Tris(-hydroxymethylaminomethan)	Merck Darmstadt
Tris-Calcium-Magnesium-Puffer (TCM)	Merck Darmstadt

8.1.2 Geräte

AutoCAP	Phadia Freiburg
Elektronische Präzisionswaage H120	Sartorius Göttingen
Fluoro-Count-Gerät 96	Phadia Freiburg
Kühlschrank mit Gefriereinheit	Bosch München
Magnetrührer IKA-Combimag RCH mit Heizplatte	Janke & Kunkel Staufen
Multifuge Heraeus	Kendro Hanau
Multipipette Plus	Eppendorf Hamburg
Novex XCell 2 Mini Cell (Elektrophoresezelle mit Bloteinsatz)	Novex (San Diego, CA, USA)
NuPAGE XCell II™ Mini-Cell	Invitrogen Karlsruhe
NuPAGE Elektrophoreseapparatur	Invitrogen Karlsruhe
Photometer Digiscan	Asys High Tech Darmstadt
Rotationsschüttler Vortex-Genie™ K-550	Bender & Hobein Zürich, Schweiz
Schüttler Titramax 101	Heidolph Instruments Schwabach
Thermomixer Comfort	Eppendorf Hamburg
Tischzentrifuge 5414	Eppendorf Hamburg
UniCAP 100	Phadia Freiburg
Zentrifuge TJ-6	Beckmann Krefeld
Zentrifuge Rotixa/KS	Hettich Kirchlingern

8.1.3 Verbrauchsmaterialien

Analysenröhrchen aus Polystyrol (Nr. 12-55)	Greiner bio-one Frickenhausen
Cellstar Tubenröhrchen, 50 ml	Greiner bio-one Frickenhausen
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf Hamburg
Filterpapier	Novex (San Diego, CA, USA)
Mikrotiterplatten	Greiner Frickenhausen
NC-Membran	Novex (San Diego, CA, USA)
Pasteurpipetten	VWR Darmstadt
Pipettenspitzen (5-1000µl)	Eppendorf Hamburg
PS-Röhrchen 12/55	VWR Darmstadt
Standzylinder (50-1000ml)	Eppendorf Hamburg

Alle Versuche wurden mit ungepuderten Einmalhandschuhen durchgeführt, um Verunreinigungen der Proben mit eigenen Proteinen zu vermeiden.

8.1.4 Gewinnung der Patientenseren

- Die maximal vier Jahre alten, bei -80°C gelagerten Rückstellseren der zwölf atopischen Patienten (Gruppe A) wurden für die Untersuchungen aufgetaut und einzeln gepoolt, so dass das jeweilige Poolserum jederzeit einer definierten Person zugeordnet werden konnte.
- Aus den zu verschiedenen Zeiten stammenden Serumproben eines einzelnen atopischen Patienten (Gruppe A) wurden jeweils 2000 μl Gesamtvolumen eines einzelnen Poolserums erstellt.
- Die Einzelseren der Probanden der Gruppen B-D wurden nicht gepoolt.

8.1.5 Proteinextraktion

Verwendete Extraktionslösung:

TCM-Puffer (pH 7,4) enthielt

*35 g NaCl

*15 g Tris

*1,5 g KCl

*1,0 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

*0,735 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

*14 ml 25% HCl

*mit Aqua bidest. auf 5 Liter aufgefüllt

Durchführung:

- Jeweils 500 mg getrocknete *Cannabis*-Blätter bzw. -Blüten wurden voneinander getrennt und klein geschnitten. Eine gegenseitige Kontamination von Blättern mit Blüten konnte dabei nicht sicher ausgeschlossen werden.
- 500 mg *Cannabis*-Samen wurden gewaschen und bei Raumtemperatur 15 Minuten getrocknet.
- Alle Pflanzenteile wurden im Mörser mit je 10 ml TCM-Puffer fein zerrieben, so dass ein konzentriertes Homogenat im polaren Lösungsmittelgemisch entstand.

- Die wasserlöslichen Proteine wurden unter ständigem Rühren im Schüttelbad 15 Stunden lang bei +4°C extrahiert.
- Um einen partikelfreien Rohextrakt zu erhalten, wurde jede Suspension zunächst 10 Minuten bei 3000 upm (Umdrehungen pro Minute) und dann 5 Minuten bei 13000 upm bei Raumtemperatur (ultra-)zentrifugiert.
- Die Überstände der Pflanzenextrakte wurden für die Proteinbestimmung und –isolierung direkt weiterverwendet bzw. aliquotiert tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt.
- Für die Biotinylierung wurden 10 ml Blütenextrakt über Nacht lyophilisiert und dann tiefgefroren aufbewahrt.

8.1.6 Bestimmung des Proteingehalts

Verwendete Lösungen:

BRADFORD-Lösung enthält

*35 mg Coomassie-Brilliant-Blau G250

*10 ml Ethanol (96%)

*20 ml Orthophosphorsäure (85%)

TCM-Puffer (pH 7,4)

Rinderserumalbumin-Stammlösung enthält

*1450 µg BSA/ml

Durchführung:

- Die Stammlösung für die Erstellung der Eichkurve bzw. Verdünnungsreihe wurde unverdünnt sowie 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 verdünnt als Standardlösung(en) eingesetzt.
- Pipettierschema für die Herstellung der Standardlösungen aus der Stammlösung:

*Stammlösung A:	700 µl BSA-Lösung	(A enthielt 1450,00 µg BSA/ml)
*Standardlösung B:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Stammlösung A	(B enthielt 725,00 µg BSA/ml)
*Standardlösung C:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Standardlösung B	(C enthielt 362,50 µg BSA/ml)
*Standardlösung D:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Standardlösung C	(D enthielt 181,25 µg BSA/ml)
*Standardlösung E:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Standardlösung D	(E enthielt 90,625 µg BSA/ml)
*Standardlösung F:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Standardlösung E	(F enthielt 45,31 µg BSA/ml)
*Standardlösung G:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Standardlösung F	(G enthielt 22,66 µg BSA/ml)
*Standardlösung H:	350 µl TCM-Puffer + 350 µl Standardlösung G	(H enthielt 11,33 µg BSA/ml)

- Die Proteinbestimmungen mit den Pflanzenextrakten wurden jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt.
- Die Pflanzenextrakte wurden jeweils unverdünnt sowie mit TCM-Lösung 1:2 und 1:4 verdünnt eingesetzt.
- Pipettierschema für die Verdünnungen der Pflanzenextrakte:
 - *Unverdünnter Extrakt: 700 µl
 - *1:2 verdünnter Extrakt: 350 µl TCM-Puffer + 350 µl unverdünnter Extrakt
 - *1:4 verdünnter Extrakt: 350 µl TCM-Puffer + 350 µl 1:2 verdünnte Extraktlösung
- Je 150 µl Stammlösung, Standardlösung oder Extraktlösung wurden - in entsprechender Reihenfolge - in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte gegeben.
- Für den Blindwert wurden 150 µl TCM-Puffer eingesetzt.
- 150 µl BRADFORD-Lösung wurde in jedes Vial hinzugefügt.
- Alle Lösungen wurden 30 Sekunden im Mikroplattenreader geschüttelt und nach 5 Minuten bei 590 nm gegen den Blindwert vermessen.
- Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve, die mithilfe der Standardlösungen erstellt wurde.

8.1.7 Gelelektrophorese

Die Aufarbeitung der Extrakte erfolgte nach VIETHS et al [245]. Die SDS-PAGE wurde mit dem NuPAGE™ Elektrophoresesystem sowie Fertiggelele und –lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend den angegebenen Vorschriften durchgeführt.

8.1.7.1 Probenvorbereitung

Verwendete Lösungen:

Probenpuffer (pH 6,8) enthält

*3,03 g Tris

*2,5 ml β-Mercaptoethanol

*5,0 ml Glycerin

*2,0 g SDS

*0,01 g Bromphenolblau

*150 µl Pyronin Y-Lösung (1 %)

*40 ml Aqua bidest.

*mit 4 mol/l HCl auf pH 6,8 eingestellt und 50 ml bidest. Wasser hinzugefügt

Reduzierungsreagenz (Reduktionsmittel) enthält

*0,5 m Dithiothreitol (DTT)

Durchführung:

- Für das Trenngel wurden die Extrakte unverdünnt sowie 1:2 und 1:4 mit Aqua dest. verdünnt in den Probenpuffer aufgenommen (siehe Tab. 24).
- Für das Transfergel wurden die Extrakte nach der vorgeschriebenen maximalen Proteinkonzentration - von 20 µg/ml im Slot - eingefüllt (Gesamtansätze waren auf je 200 µl begrenzt, vgl. Tab. 25).
- Jedem Probenextrakt wurde im Trenn- bzw. Transfergel die gleiche Menge Reduktionsmittel (10 µl bzw. 20 µl) zugesetzt.
- Die Lösungen wurden mittels Vortex gemischt und 10 Minuten bei 70°C im Thermo-mixer reduziert.
- Jedem Gel wurde (vor der Füllung der Vertiefungen mit Proteinextrakten) jeweils 3 µl Molekulargewichtsmarker in das erste Slot pipettiert. Die Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers zeigt Tabelle 26.

8.1.7.2 SDS-PAGE

Verwendete Lösungen:

Elektrodenpuffer (50 ml Fertiglösung NuPAGE™ MES-SDS Running Buffer) für die äußere Kammer enthielt

- *97,6 g MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure)
- *60,6 g Tris Base
- *10,0 g SDS
- *3,0 g EDTA
- *950 ml bidest. Wasser

Elektrodenpuffer für die innere Kammer enthielt

- *500 µl NuPAGE Antioxidans
- *200 ml Elektrodenpuffer der äußeren Kammer

Fertiggele:

- *NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris-Gel
- *Totalamidkonzentration 4-12 %
- *Bis-Tris-Puffer
- *Maße: 8 cm x 8 cm x 1 mm
- *Geltyp: 12 well

Geräteparameter:

*Xcell SureLock™ Mini-Cell

*Spannung: 200V

*Stromstärke: 120 mA

*Dauer: 35 Minuten

Durchführung:

- Die Gelkassette wurde aus der Folienverpackung entnommen.
- Die beiden Kunststoffplatten wurden mit Wasser abgespült.
- Der Klebestreifen wurde von der Unterseite der Gelkassette entfernt.
- Der Kamm wurde aus der Gelkassette herausgezogen.
- Die Geltaschen wurden mit einer Spritzennadel ausgespült.
- Die Gelkassette wurde entsprechend der Novex NuPAGE™-Anleitung in der Elektrophoresekammer fixiert.
- Die Elektrodenpuffer wurden in die Kammern gefüllt.
- Die Slots wurden mit dem MG-Marker bzw. den reduzierten Probelösungen beladen (siehe Tab. 24-25).
- Die Elektrophoresekammer wurde geschlossen und 200 V Spannung angelegt.
- Der Lauf wurde beendet, sobald der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau an der Anode angelangt war.
- Sobald der Strom abgeschaltet war, wurde die Elektrophoresekammer geöffnet und die Gelkassette entnommen.
- Die Gelkassette wurde mit einem Novex-Spatel aufgebrochen und das Gel vom Kunststoffträger gelöst.

Tab. 24: Konfigurationen der Slots in den Trenngelen

Gel	Gesamt- ansatz (μ l)	Verdünnung	Protein- konzentration (μ g/ml)	Extrakt (μ l)	Aqua dest. (μ l)	Proben- puffer (μ l)	Reduktions- mittel (μ l)
Trenngel				<i>Cannabis- Blattextrakt</i>			
	100	unverdünnt	40	55	10	25	10
	100	1:2	20	27,5	37,5	25	10
	100	1:4	10	13,8	51,2	25	10
				<i>Cannabis- Blütenextrakt</i>			
	100	unverdünnt	40	65	0	25	10
	100	1:2	20	32,5	32,5	25	10
	100	1:4	10	16,3	48,7	25	10
				<i>Cannabis- Samenextrakt</i>			
	100	unverdünnt	19,5	65	0	25	10
	100	1:2	9,75	32,5	32,5	25	10
	100	1:4	4,875	16,3	48,7	25	10

Tab. 25: Konfigurationen der Slots im Transferringel

Gel	Gesamt- ansatz (μ l)	Proteinkonzentration (μ g/ml)	Extrakt (μ l)	Aqua dest. (μ l)	Proben- puffer (μ l)	Reduktions- mittel (μ l)
Transferringel			<i>Cannabis- Blattextrakt</i>			
	200	20	55	75	50	20
			<i>Cannabis- Blütenextrakt</i>			
	200	20	36	94	50	20
			<i>Cannabis- Samenextrakt</i>			
	200	20	65	65	50	20

Tabelle 26: Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers

Markerprotein	MG
Myosin	185 kDa
Phosphorylase	98 kDa
Glutamatdehydrogenase	52 kDa
Carboanhydrase	31 kDa
Rotes Myoglobin	19 kDa
Blaues Myoglobin	17 kDa
Lysozym	11 kDa
Aprotinin	6 kDa
Insulin	3 kDa

8.1.8 Unspezifische Proteinfärbung elektrophoretisch getrennter Gele

8.1.8.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung verlief nach HEUKESHOVEN und DERNICK [197]. Die freipräparierte Minigelmatrix wurde mit frisch hergestellten Lösungen aus dem Silberkit Plusone (Pharmacia Biotech Freiburg) behandelt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind der Tabelle 27 zu entnehmen.

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung enthält

*100 ml Ethanol absolut

*25 ml konz. Essigsäure

*mit Aqua bidest. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt

Imprägnierlösung enthält

*75 ml Ethanol absolut

*1,25 ml Glutardialdehydlösung (25 %)

*10 ml Natriumthiosulfatlösung

*17 g Natriumacetat

*mit Aqua bidest. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt

Färbelösung enthält

*25 ml Silbernitratlösung (2,5 %)

*0,1 ml Formaldehydlösung (37 %)

*mit Aqua bidest. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt

Entwicklerlösung enthält

*6,25 g Natriumcarbonat

*0,05 ml Formaldehydlösung (37 %)

*mit Aqua bidest. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt

Stopplösung enthält

*3,65 g EDTA- $\text{Na}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

*mit Aqua bidest. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt

Präservierlösung enthält

*75 ml Ethanol absolut

*11,5 ml Glycerin (87 %)

*mit Aqua bidest. auf 250 ml Gesamtvolumen aufgefüllt

Hintergrundaufhellungslösung (pH 5-6) enthielt

*248 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

*3,7 Tris

*100 ml Aqua bidest.

Durchführung:

Tab. 27: Protokoll der Silberfärbung

Schritt(e)	Lösungen	Zeit(dauer)
Fixieren	100 ml Fixierlösung	30 min
Imprägnieren	100 ml Imprägnierlösung	30 min
Spülen	250 ml Aqua bidest.	3 x 5 min
Färben	100 ml Färbelösung	20 min
Waschen	250 ml Aqua bidest.	2 x 1 min
Entwickeln	100 ml Entwicklerlösung	maximal 2 min
Stoppen	100 ml Stopplösung	10 min
Kontrastieren	100 ml Hintergrundaufhellungslösung	15 min
Waschen	250 ml Aqua bidest.	3 x 5 min
Präservieren	100 ml Präservierlösung	über Nacht

- Alle Behandlungsschritte (siehe Tab. 27) erfolgten in einer Kunststoffwanne unter ständigem Schütteln auf einer Schüttelbank.
- Für jeden Arbeitsschritt wurden frisch zubereitete Lösungen verwendet.
- Das Gel musste von den Lösungen immer benetzt sein.
- Alle Lösungen wurden nach jedem Vorgang abgegossen.
- Das Gel wurde im Trockenschrank (bei Raumtemperatur) über Nacht getrocknet.
- Die Dokumentation des gefärbten Gels erfolgte durch Fotografieren und Scannen mit anschließender Bildbearbeitung.

8.1.8.2 Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Die Färbung erfolgte modifiziert nach FLING und GREGERSON [198].

Verwendete Färbelösung:

Färbekit „Simply BlueTM Safe Stain“ (Invitrogen Karlsruhe) enthielt

*CBB G-250

*Methanol

*Essigsäure

Durchführung:

- Nach SDS-PAGE wurden die Gele auf einem Schüttler (in einer abgedunkelten Inkubationswanne) jeweils dreimal 5 Minuten lang mit je 100 ml Aqua dest. gespült.
- Zur Detektion inkubierten die Gele jeweils 60 Minuten im kommerziellen Färbekit Simply Blue™ Safe Stain.
- Die Hintergrundentfärbung verlief in je 100 ml Aqua dest. zweimal 60 Minuten lang.
- Die Dokumentation des gefärbten Gels erfolgte durch Fotografieren und Scannen mit anschließender Bildbearbeitung.

8.1.9 Westernblot

Sowohl die Gel-Elektrophorese der Proteine als auch ihr anschließender Transfer auf eine NC-Membran wurden in ein und derselben Novex Elektrophoresezelle XCell 2 Mini Cell (Einsatz für Blot) durchgeführt. Diese wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut sowie die kommerziell erhältlichen Puffer mit NC-Membranen und Filter eingesetzt.

Verwendete Lösung:

Transferpuffer (1000 ml) enthielt

*50 ml Novex 20X NuPAGE Transfer Buffer (Cat. No. N0006)

*1 ml NuPAGE Sample Antioxidant

*100 ml Methanol

*849 ml bidest. Wasser

Verwendete Verbrauchsmaterialien:

Nitrocellulose-(NC)-Membran (Novex No. LC2000):

*Maße 7,5 x 8,3 cm

*Porengröße 0,2 µm

*Bindungskapazität 209 µg/cm²

*Quantität 20/pk

Filterpapier:

*Blotting Filterpapier Novex Nr. LC 2010

*Dicke 2,5 mm

*Größe 7,5 x 8,4 cm

Durchführung:

- In 700 ml des Transferpuffers wurden vier Schwämmchen getränkt und sanft ausgedrückt. Dabei sollten Luftblasen vermieden oder entfernt werden, da sie den Transfer blockieren konnten.
- Zwei der Schwämmchen wurden nach Vorschrift im Kathodenboden des Moduls plaziert.
- Das von der Firma Novex (San Diego, CA, USA) vorgefertigte Filterpapier wurde kurz im Transferpuffer eingeweicht und dann auf die beiden feuchten Schwämmchen gelegt.
- Anschließend wurde das Transfergel mittig auf dem Schwämmchen-Filterpapier-Stapel postiert.
- Dann folgte die NC-Membran, die zuvor einige Minuten mit Transferpuffer getränkt worden war.
- Den Abschluss des Gel-Membran-Sandwiches bildeten ein weiteres getränktes Filterpapier sowie zwei getränkte Schwämmchen.
- Es war darauf zu achten, dass das Gel mit den anionischen Proteinen zur kathodischen (negativ geladenen) Unterseite der Blotwanne zeigte, und die NC-Membran zum Deckel, wo sich die (positive) Anodenseite befand. Nur so konnten sich die Proteine vom Transfergel in Richtung Anode bewegen und auf der NC-Membran gebunden werden.
- Es musste überprüft werden, dass sich zwischen Gel und NC-Membran keine Luftblasen befanden.
- Das Blot-Modul wurde zusammengebaut und mit Transferpuffer gefüllt, bis oberhalb der (anodischen) Elektrode noch 1 cm Luftraum frei blieb.
- Nach Verschluss mit der Plastikabdeckung erfolgte der Protein-Transfer 60 Minuten lang bei 25 Volt, 160 Milliampere und 17 Watt.
- Die freipräparierte NC-Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet.

8.1.10 Immunoblot

Die immunochemische Detektion erfolgte nach einer Methode von VIETHS et al [245, 246].
Für die Tests kamen die Reagenzien AlaBLOT (Biermann Bad Nauheim) zum Einsatz.

Verwendete Lösungen:

Anti-IgE-Enzymkonjugat-Lösung (Nr. ABEI2, gebrauchsfertig) enthielt

*Anti-Human-IgE-Immunglobulin (monoklonal, Maus)

*gekoppelt mit alkalischer Phosphatase

Spezifisches IgE-Probendiluent (ABSD2, gebrauchsfertig) enthielt

*Proteine

*Pufferlösung

Substratlösung (ABSB2, gebrauchsfertig) enthielt

*4'Chlor-3'Indolyl-Phosphat-Toluoidin (BCIP)

*4'Nitro-Tetrazolium Chloridblau (NBT)

*in stabilisierender Pufferlösung

Gepufferte Waschlösung (ABWS2, Konzentrat wurde verdünnt) enthielt

*Proteine

*Pufferlösung

*240 ml dest. Wasser

Durchführung:

- Die Begrenzungslinie des MG-Markers wurde durch einen waagrechten Strich (mit Kugelschreiber) über der ganzen NC-Folie markiert.
- Die selbst gefertigten getrockneten NC-Folien wurden in 3 mm breite Streifen geschnitten.
- Die IB-Streifen mussten von den verwendeten Lösungen immer vollständig benetzt sein.
- Alle Behandlungsschritte wurden durch stetiges Schütteln auf einem Wippschüttler beschleunigt.
- Jeder IB-Streifen wurde zunächst mit 1 µl Waschpuffer überschichtet.
- Nach der 10-minütigen Rehydrierung wurde die Waschlösung abgesaugt.
- Die IB-Streifen wurden mit verdünnten Seren (150 µl Serum mit 150 µl Waschpuffer) überschichtet und die Inkubationswannen zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm abgedeckt.

- Die Inkubation der Seren erfolgte über Nacht.
- Der Überstand wurde abgesaugt und jeder IB-Streifen dreimal 10 Minuten lang mit 1000 µl Waschpuffer gewaschen.
- Je 500 µl Anti-IgE-Enzymkonjugat-Lösung wurde in jedes Reservoir pipettiert.
- Die zweite Inkubation dauerte 30 Minuten.
- Das überschüssige Konjugat (mit den enzymmarkierten Zweitantikörpern) wurde durch dreimaliges zehnminütiges Waschen mit je 1000 µl Waschpuffer entfernt.
- Danach wurde 500 µl Substrat-Lösung in jede Kavität pipettiert.
- Für die enzymatische Farbreaktion galten 15 Minuten Inkubationszeit als Richtwert. Die Farbreaktion wurde ständig beobachtet: War keine Färbänderung mehr zu sehen oder hatten sich die IB-Streifen bereits dunkel gefärbt, wurde die Reaktion beendet.
- Die enzymatische Farbreaktion wurde durch Absaugen von überschüssigem Substrat und durch dreimaliges zehnminütiges Waschen mit je 1000 µl Waschpuffer gestoppt.
- Die gefärbten IB-Streifen trockneten auf Filterpapier.

8.1.11 Biotinylierung

Für die Biotinylierung wurde der Biotin Labeling Kit von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Alle kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden nach Vorschrift zu frischen Lösungen angesetzt. Von den zur Verfügung gestandenen Sephadex G-25 Säulen für Protein-Markierungen wurden zwei benötigt.

Verwendete Lösungen:

Blockierungslösung enthielt

*Blockierungsreagenz BSA

*in 300 ml bidest. Wasser

PBS-Lösung enthielt

*8,0 g NaCl

*0,2 g KCl

*1,42 g Na₂HPO₄

*0,27 g KH₂PO₄

*in 1000 ml bidest. Wasser

DMSO-Lösung enthielt

*2,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

Biotin-7-NHS-Lösung (20 mg/ml) enthielt

*5 mg D-Biotinoyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester

*in 250 µl DMSO

Durchführung:

- Jeweils 1 mg lyophilisierter *Cannabis*-Extrakt (jeweils aus –Blättern bzw. -Blüten) wurde in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen.
- 10 µl frisch hergestellte Biotin-7-NHS-Lösung (20 mg/ml) wurde mit DMSO 1:10 verdünnt (10 µl Biotin-7-NHS Lösung + 90 µl DMSO).
- Jeweils 15 µl dieser verdünnten (2 mg/ml) Biotin-7-NHS-Lösung wurden unter Rühren zu je 15 µl der gelösten *Cannabis*-Extrakte gegeben.
- Die Inkubation der *Cannabis*-Extrakte erfolgte bei 20°C unter schwachem Rühren im Schüttelbad zwei Stunden lang.
- Jede Sephadex-Säule wurde inzwischen so vorbereitet: Nach ihrer Fixierung in vertikaler "Ruheposition" an einem Stativ wurde jeweils der obere Stopfen entfernt und dann die untere Kappe abgeschnitten: Jetzt konnte der flüssige Inhalt der vorgequollenen Säule auslaufen.
- Dann lief 5 ml Blockierungslösung (zur Absättigung) durch die Säule.
- Überschüssige Blockierungslösung wurde von der Säule entfernt, indem diese sechsmal mit je 5 ml PBS-Lösung gespült wurde.
- Die Volumina der biotinylierten *Cannabis*-Extrakte wurden jeweils mit verdünntem DMSO auf 2,5 ml aufgefüllt und auf die einzelnen Säulen aufgetragen.
- Die markierten *Cannabis*-Proteinextrakte wurden mit 5 ml PBS-Lösung eluiert, wobei die ersten 44 Tropfen in Pools von je 11 Tropfen in jeweils 4 Reagenzgläsern gesammelt wurden. Das Haupteluat befand sich im dritten Reagenzglas (zwanzigster bis dreißigster Tropfen).
- Die biotinylierten *Cannabis*-Proteine wurden im UniCAP 100 (Phadia Freiburg) automatisiert an Streptavidin-aktivierte CAPs gekoppelt.

8.1.12 CAP-Inhibition

Für die CAP-Inhibitionen stand das ImmunoCAP 250 (Phadia Freiburg) zur Verfügung. Das Referenzsystem bezog sich auf YMAN et al. [247].

Verwendete Lösung:

TCM-Puffer (pH 7,4)

Durchführung:

- Für die Festphasen wurden kommerziell erhältliche Allergenträger aus Gräserpollen- bzw. Birkenpollenextrakt sowie der biotinylierte Proteinextrakt aus *Cannabis*-Blüten verwendet.
- Für die Flüssigphasen wurden kommerziell erhältliche Pricklösungen mit Gräserpollen- bzw. Birkenpollenextrakt sowie die selbst gefertigten Extrakte aus *Cannabis*-Blüten und –Samen eingesetzt.
- Der (Puffer-)Basiswert der Inhibition ergab sich jeweils aus 20 µl TCM-Puffer mit 180 µl Serum.
- Für den Inkubationsansatz wurden jeweils 20 µl (Allergen-)Extraktlösung mit 180 µl Serum vermischt. Dieser Inhibitionsansatz ergab den Ausgangswert mit der Verdünnung gleich null (unverdünnter Inhibitionsansatz).
- Die Inhibitionsansätze wurden jeweils 1:10 und 1:100 verdünnt (Tab. 28-31), so dass die Endansätze jeweils 1:100 betrugen.
- Alle Inhibitionsansätze wurden parallel und über Nacht im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert.
- Nach der Inkubation wurden die Proben bei 3000 upm 10 Minuten lang zentrifugiert.
- Dann wurden die abzentrifugierten Überstände der Proben automatisiert im UniCAP 250 (Phadia Freiburg) gemessen.
- Die ermittelten Werte wurden in ein Excel-Dokument eingegeben.

8.1.12.1 Autoinhibitionen (jeweils Ansatz 2-4)

Eigeninhibition des Gräserpollen-CAP: Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 wurden mit (frei in der Flüssigphase befindlichen) Gräserpollenallergenen vorinkubiert. Anschließend wurden die abzentrifugierten Überstände der Seren jeweils mit festphasengebundenen Gräserpollenantigenen im CAP-FEIA auf spezifisches IgE gegen Gräserpollenallergene untersucht (vgl. Tabelle 28).

Eigeninhibition des Birkenpollen-CAP: Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 wurden mit (frei in der Flüssigphase befindlichen) Birkenpollenallergenen vorinkubiert. Dann wurden die abzentrifugierten Überstände der Seren jeweils mittels festphasengebundener Birkenpollenantigene im CAP-FEIA auf spezifisches IgE gegen Birkenpollenallergene getestet (vgl. Tabelle 29).

Eigeninhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP: Die Seren Nr. 1, Nr. 7 und Nr. 13 wurden mit (frei in der Flüssigphase befindlichen) *Cannabis*-Blütenallergenen vorinkubiert. Danach wurden die abzentrifugierten Überstände der Seren jeweils mit festphasengebundenen *Cannabis*-Blütenantigenen im CAP-FEIA auf spezifisches IgE gegen *Cannabis*-Blütenallergene gemessen (vgl. Tabellen 30-31).

8.1.12.2 Fremdinhibitionen

Inhibition des Gräserpollen-CAP durch *Cannabis*-Blütenallergene: Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 wurden mit (frei in der Flüssigphase befindlichen) *Cannabis*-Blütenallergenen vorinkubiert. Anschließend wurden die abzentrifugierten Überstände der Seren jeweils mittels festphasengebundener Gräserpollenantigene im CAP-FEIA auf spezifisches IgE gegen Gräserpollenallergene untersucht (vgl. Tabelle 28, Ansatz 5-7).

Inhibition des Birkenpollen-CAP durch *Cannabis*-Blütenallergene: Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 wurden mit (frei in der Flüssigphase befindlichen) *Cannabis*-Blütenallergenen vorinkubiert. Dann wurden die abzentrifugierten Überstände der Seren jeweils mit festphasengebundenen Birkenpollenantigenen im CAP-FEIA auf spezifisches IgE gegen Birkenpollenallergene getestet (vgl. Tabelle 29, Ansatz 5-7).

Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen- oder Birkenpollenallergene: Die Seren Nr. 1 und Nr. 7 wurden mit (frei in der Flüssigphase befindlichen) Gräserpollen- bzw. Birkenpollenallergenen vorinkubiert. Danach wurden die abzentrifugierten Überstände der Seren jeweils anhand festphasengebundener *Cannabis*-Blütenantigene im CAP-FEIA auf spezifisches IgE gegen *Cannabis*-Blütenallergene gemessen (vgl. Tabelle 30, Ansatz 5-10).

Inhibition des *Cannabis*-Blüten-CAP durch Gräserpollen- oder Birkenpollen- oder *Cannabis*-Samenallergene: Das Serum Nr. 13 wurde mit (frei in Lösung befindlichen) Gräserpollen- bzw. Birkenpollen- bzw. *Cannabis*-Samenallergenen vorinkubiert. Daraufhin wurde in den abzentrifugierten Überständen des Serums jeweils mit festphasengebundenen *Cannabis*-Blütenantigenen im CAP-FEIA das spezifische IgE gegen *Cannabis*-Blütenallergene bestimmt (vgl. Tabelle 31, Ansatz 5-13).

Tab. 28: Pipettierschema der CAP-Inhibition festphasengebundener Gräserpollenallergene durch *Cannabis*-Blütenallergene (mit den Seren Nr. 1 und Nr. 7)

festphasengebundene Allergene aus Gräserpollenextrakt	Serum Nr. 1 bzw. Nr. 7	Vorinkubation mit	Verdünnung des Inhibitionsansatzes
Ansatz 1	180 µl	20 µl TCM	- (Puffer-)Basiswert
Ansatz 2 Gräserpollen-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung	0
Ansatz 3 Gräserpollen-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung aus Ansatz 2	1:10
Ansatz 4 Gräserpollen-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung aus Ansatz 3	1:100

Ansatz 5 Gräserpollen-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung	0
Ansatz 6 Gräserpollen-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 5	1:10
Ansatz 7 Gräserpollen-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 6	1:100

Tab. 29: Pipettierschema der CAP-Inhibition festphasengebundener Birkenpollenallergene durch *Cannabis*-Blütenallergene (mit den Seren Nr. 1 und Nr.7)

festphasengebundene Allergene aus Birkenpollenextrakt	Serum Nr. 1 bzw. Nr. 7	Vorinkubation mit	Verdünnung des Inhibitionsansatzes
Ansatz 1	180 µl	20 µl TCM	- (Puffer-)Basiswert
Ansatz 2 Birkenpollen-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung	0
Ansatz 3 Birkenpollen-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung aus Ansatz 2	1:10
Ansatz 4 Birkenpollen-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung aus Ansatz 3	1:100
Ansatz 5 Birkenpollen-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung	0
Ansatz 6 Birkenpollen-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 5	1:10
Ansatz 7 Birkenpollen-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 6	1:100

Tab. 30: Pipettierschema der CAP-Inhibition festphasengebundener *Cannabis*-Blüten-allergene durch Gräserpollen- oder Birkenpollenallergene
(mit den Seren Nr. 1 und Nr. 7)

festphasengebundene Allergene aus <i>Cannabis</i> -Blütenextrakt	Serum Nr. 1 bzw. Nr. 7	Vorinkubation mit	Verdünnung des Inhibitionsansatzes
Ansatz 1	180 µl	20 µl TCM	- (Puffer-)Basiswert
Ansatz 2 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung	0
Ansatz 3 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 2	1:10
Ansatz 4 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 3	1:100
Ansatz 5 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung	0
Ansatz 6 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung aus Ansatz 5	1:10
Ansatz 7 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung aus Ansatz 6	1:100
Ansatz 8 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung	0
Ansatz 9 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung aus Ansatz 8	1:10
Ansatz 10 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung aus Ansatz 9	1:100

Tab. 31: Pipettierschema der CAP-Inhibition festphasengebundener *Cannabis*-Blüten-allergene durch Gräserpollen- oder Birkenpollen- oder *Cannabis*-Samenallergene (mit Serum Nr. 13)

festphasengebundene Allergene aus <i>Cannabis</i> -Blütenextrakt	Serum Nr. 13	Vorinkubation mit	Verdünnung des Inhibitionsansatzes
Ansatz 1	180 µl	20 µl TCM	- (Puffer-)Basiswert
Ansatz 2 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung	0
Ansatz 3 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 2	1:10
Ansatz 4 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Blütenextraktlösung aus Ansatz 3	1:100
Ansatz 5 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung	0
Ansatz 6 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung aus Ansatz 5	1:10
Ansatz 7 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Gräserpollenextraktlösung aus Ansatz 6	1:100
Ansatz 8 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung	0
Ansatz 9 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung aus Ansatz 8	1:10
Ansatz 10 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl Birkenpollenextraktlösung aus Ansatz 9	1:100
Ansatz 11 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Samenextraktlösung	0
Ansatz 12 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Samenextraktlösung aus Ansatz 11	1:10
Ansatz 13 <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP	180 µl	20 µl <i>Cannabis</i> -Samenextraktlösung aus Ansatz 12	1:100

8.2 Serenprofile der Patienten

Tab. 32: Charakteristika der Patientenseren (Gruppen A-D)

Nr.	Patienten- gruppe	Gesamt- IgE (kU/l)	CAP-Klasse					IgE-Immunoblot		
			D. pter.	Gräser- pollen	Birken- pollen	Cannabis- Blätter	Cannabis- Blüten	Cannabis- Blätter	Cannabis- Blüten	Cannabis- Samen
1	A	851,0	0	4	5	3	3	++	++	++
2	A	1217,0	1	4	6	2	2	+	++	-
3	A	600,0	2	3	4	2	2	++	++	++
4	A	955,0	6	0	0	1	0	-	-	-
5	A	1704,0	2	2	0	1	1	++	++	++
6	A	1982,0	6	4	4	2	3	++	++	++
7	A	698,0	0	4	4	3	3	++	++	++
8	A	926,0	3	4	5	2	2	++	++	++
9	A	1586,0	6	4	1	2	2	+	++	++
10	A	255,0	4	0	0	0	0	-	-	-
11	A	287,0	4	4	4	2	3	++	++	++
12	A	2243,0	3	4	4	2	3	++	++	++
13	B	266,0	0	0	0	4	5	+	+	-
14	B	169,0	2	0	2	2	2	-	-	+
15	C	11,9	0	0	0	0	0	-	-	-
16	C	16,9	0	0	0	1	1	-	-	-
17	C	79,1	0	0	0	1	0	-	-	-
18	C	5,2	0	0	0	0	0	++	++	++
19	C	17,3	0	0	0	1	0	-	-	-
20	D	50,8	3	2	2	0	0	NB	NB	NB
21	D	26,7	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
22	D	18,1	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
23	D	43,0	3	3	3	0	0	NB	NB	NB
24	D	41,2	0	2	0	0	0	NB	NB	NB
25	D	44,7	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
26	D	406,0	1	4	0	0	0	NB	NB	NB
27	D	96,7	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
28	D	246,0	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
29	D	61,1	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
30	D	57,2	0	0	0	1	1	NB	NB	NB
31	D	92,6	3	4	4	1	1	NB	NB	NB
32	D	122,0	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
33	D	2,0	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
34	D	8,4	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
35	D	13,7	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
36	D	16,7	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
37	D	2,0	0	0	0	0	0	NB	NB	NB
38	D	64,3	0	0	0	1	0	NB	NB	NB
39	D	11,6	0	2	0	0	0	NB	NB	NB

KA = keine Angaben, NB = nicht bestimmt

++ = deutliche Bande(n) + = schwache Bande(n)

8.3 Literaturverzeichnis

- [1] Clarke RC (1998) Hashish. Los Angeles. Red Eye Press
- [2] Brown DT (1998) Cannabis. The genus *Cannabis*. Vol. 4. Amsterdam, Harwood. Academic Publishers: 272
- [3] Böllert K, Otto H-U (1993) Umgang mit Drogen. Bielefeld: 76-96
- [4] BtMG vom 01.08.1981, BGBl. I: 681, 1187; letzte Änderung am 01.01.2011 durch BGBl. I: 2262, 2272
- [5] Simon R, Spegel H, Hüllinghorst R, Nöcker G & David-Spickermann M (2002) Bericht des Nationalen REITOX Knotenpunkts für Deutschland an die EBDD: Drogensituation 2001. München: DBDD
- [6] Polizeiliche Kriminalstatistik 2010
- [7] Volk R-B (2011) Zeitschrift Phytotherapie. 32(5): 202-8
- [8] Grimm A (1927) Überempfindlichkeit gegen Kautschuk als Ursache von Urtikaria und Quinkeschem Ödem. Klein Wochenschr 6: 1479
- [9] Stern G (1927) Überempfindlichkeit gegen Kautschuk als Ursache von Urtikaria und Quinkeschem Ödem. Klein Wochenschr 6: 1096-7
- [10] Rueff F, Schöpf P, Putz K, Stratakis D, Lang S, Huber RM, Przybilla B (2003) Risikofaktoren und Verlauf der Naturlatexallergie vom Soforttyp. Abschlussbericht 15-6
- [11] Liskow B, Liss JL, Parker CW (1971) Allergy to marihuana. Ann Intern Med 75: 571-3
- [12] Payne RJ and Brand SN (1975) The toxicity of intravenously used marihuana. JAMA 233: 351-4
- [13] Hyun BH, Guillani GL, Moss SW and Parkekh AK (1978) Adverse reaction to intravenously injected marihuana. J Med Soc N J 15: 853-4
- [14] Mims RB and Lee JH (1977) Adverse effects of intravenous *Cannabis* tea. J Natl Med Assoc 69: 491-5
- [15] Farber SJ and Uertas VE (1976) Intravenously injected marihuana syndrome. Arch Intern Med 136: 337-9
- [16] Brandenburg D and Wernick R (1986) Intravenous marijuana syndrome. West J Med 145: 94-6
- [17] Hoffmann W, Mudra A, Plarre W (1985) Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Band 2, Spezieller Teil. Paul Parey Verlag. Berlin/Hamburg: 344-9
- [18] Emboden WA (1998) Vorwort zu Rätsch C. Hanf als Heilmittel – Ethnomedizin, Anwendungen und Rezepte
- [19] Schneebli-Graf R (1992) Nutz- und Heilpflanzen Chinas – Botanische Berichte und Bilder aus China. Thomae Frankfurt am Main
- [20] Encyclopedia Britannica. Retrieved 10.04.10
- [21] Auszug aus dem von Dewey L verfassten Hanf-Kapitel im Jahrbuch (1913) des amerikanischen Landwirtschaftsministeriums: 283-93
- [22] Abel EJ (1980) Marijuana – The first twelve thousand years. New York. Kap. I
- [23] The columbia history of the world (1981): 54
- [24] Adams JT (1944) Album of american history. Charles Scribner's Sons. New York: 116
- [25] Waskow F (1995) Hanf & Co. - Die Renaissance der heimischen Faserpflanzen. Katalyse-Institut Göttingen: 23-6
- [26] Behr HG (1985) Von Hanf ist die Rede. Rowohlt
- [27] Hai H und Rippchen R (1994) Das Hanfhandbuch. Der grüne Zweig: 12
- [28] Müller M (2003) Die Kleidung nach Quellen des frühen Mittelalters. Textilien und Mode von Karl dem Großen bis Heinrich III. Müller R (Hrsg.) Ergänzungsbände zum Reallexikon der Germanischen Altertumskunde. Band 33. Berlin, New York

- [29] Rubin V (1976) Research institute for the study of man. Östliche Orthodoxe Kirche. Cohen S, Stillman RC: Therapeutic potential of marijuana. Plenum Press
- [30] Wagenitz G, Hegi G (1981) Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Pteridophyta, Spermatophyta. Bd. 3. Angiospermen, Dicotyledones, Teil 1. 3. überarbeitete und erweiterte Aufl: 387
- [31] Rothmaler W, Natho I (1957) Bandkeramische Kulturpflanzenreste in Thüringen und Sachsen, in: Beiträge zur Frühgeschichte der Landwirtschaft 3
- [32] Wasson RG (1969) Divine mushroom of immortality. Allegro JM (1969) Sacred mushroom & the cross. Doubleday. New York
- [33] El-Ghany MEA (2002) Molekulargenetische Diversität einer monözischen und einer diözischen Hanfsorte und Analyse des Fasergehalts von verschiedenen Hanfformen. Dissertation. Halle: 11
- [34] Bayerl G, Pichol K (1986) Papier – Produkt aus Lumpen, Holz und Wasser. Reinbeck sowie Schlieder W (1984) Papier – Traditionen eines alten Handwerks. Leipzig
- [35] Junkers S (1998) Die Legalisierung von *Cannabis*-Produkten: 4
- [36] Oxford English dictionary (1910) Encyclopaedia britannica. 11. Auflage
- [37] Shushan ER (1990) Grave matters. Ballantine books South Dakota. New York
- [38] Clark VS (1929) History of manufacture in the United States. McGraw Hill New York: 34
- [39] Albert YL (1998) Chinesische Heilkräuter. Diederichs München. 5. Aufl
- [40] Mikuriya TH (1939-1972, 1973) Marijuana medical papers. Medi-Comp Press. Oakland Kalifornien
- [41] Thamm BG (1989) Zur Geschichte des Opiums. Seefelder M (1987) Opium. Frankfurt. Behr HG (1984) Weltmacht Droge
- [42] Kress HG, Kraft B (2006) Schmerzbehandlung in der Palliativmedizin. Springer Verlag: 92-3
- [43] Sloman L (1979) Reefer madness. Grove Press New York: 72
- [44] Papier – Geschichte und Produkte (1990) Bausteine für das MVT. Museum für Verkehr und Technik. Berlin
- [45] Tanner J (1996) The times they are a-changin. Zur subkulturellen Dynamik der 68er Bewegungen. Kap 16: 214-8
- [46] International Opium Convention. 19. Februar 1925. L.N.T.S. (League of Nations Treaty Series) No. 1845: 317-358. Art. 1: 329
- [47] Reichsgesetzblatt (1929) II: 414
- [48] Bundesgesetzblatt I (1972): 1
- [49] Zimmer L, Morgan JP (1997) Marijuana myths – marijuana facts. New York. WHO (1997): *Cannabis* a health perspective and research agenda. WHO/MSA/PSA/97.4
- [50] Holzer T (2004) Globales *Cannabis*regulierungsmodell. Verein für Drogenpolitik e.V. Mannheim
- [51] Webpräsenz der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2011
- [52] Polizeiliche Kriminalstatistik von 2010. Rechtliche Aspekte von *Cannabis*
- [53] Hall W (1995) The public health significance of *Cannabis* use in Australia. Aust J Public Health 19: 235-42
- [54] Poulton RG, Brooke M, Moffitt TE, Stanton WR, Sivla PA (1997) Prevalence and correlates of *Cannabis* use and dependence in young New Zealanders. N Z Med J 110: 68-70
- [55] Täschner K (2007) Das *Cannabis*-Problem. Epidemiologie: Drogen- und Suchtbericht der Drogenbeauftragten der Bundesregierung *Cannabis* 2006
- [56] Der Spiegel (1969) Die Haschisch Welle. 46: 78

- [57] Generalversammlung der Vereinten Nationen, Sondertagung über das Weltrogenproblem, New York, 08.-10.06.1998. Informationsblatt Nr. 2: Illegale Herstellung, Handel und Konsum von Drogen. Die wichtigsten statistischen Angaben
- [58] Bundeskriminalamt (Hrsg.): Rauschgiftjahresbericht 2002. In: bka.de. 2002: 172
- [59] Ottich I (2006) Ein Buch von alten Fasern. 2. Aufl: 21
- [60] Singh AB, Kumar P (2003) Aeroallergens in clinical practise of allergy in India – an overview. Ann Agric Environ Med 10: 131-6
- [61] Cabezudo B, Recio M, Sanchez-Laulhe JM, Trigo MM, Toro FJ, Polvorinos F (1997) Atmospheric transportation of marihuana pollen from North Africa to the Southwest of Europe. Atmospheric Environ 31: 3323-8
- [62] Popular mechanics (Februar 1938) Mechanical engineering. US-Landwirtschaftsministerium
- [63] Baden W (1986) Hanf auf Niedermoor und niedermoorartigen Böden – eine agrarpolitische und agrarwirtschaftliche Alternative. TELMA Bd 16. Hannover
- [64] Cavender J (16.11.1989) Authorities examine pot claims. Universität von Ohio. Athens News
- [65] Teramura A (1989) Studie der University of Maryland. Discover Magazine
- [66] Mathieu IP (1980) Le Chanvre. Techniques agricoles Nr. 2130. Körber-Grohne Udelgard (1988) Nutzpflanzen in Deutschland. Konrad Theiss Verlag. FAO Yearbook of Food and Agriculture Statistics 1957 und 1991
- [67] Karus M (2005) Europäische Hanfwirtschaft 2001 bis 2004: Anbau, Rohstoffe, Produkte und Trends. EIHA und Nova-Institut: 1-3
- [68] Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (22.10.07) Verordnung (EG) Nr. 1234/2007 des Rates
- [69] Reuter K (1987) Anbau und Verwendung von Hanf (*Cannabis sativa* L.) als Lieferant von Fasern, Samen und Rauschdrogen. Diplomarbeit an der Universität Bonn.
- [70] New encyclopedia britannica-micropedia (1974) Vol. II 15th Ed. Chicago. Hemingway Benton H (Publisher)
- [71] Rothmaler W (1972) Exkursionsflora. Gefäßpflanzen. Berlin: 137-8
- [72] von Sengbusch R (1952) Ein weiterer Beitrag zur Vererbung des Geschlechts bei Hanf als Grundlage für die Züchtung eines monözischen Hanfes. Der Züchter 15: 49-62
- [73] Loch L (1995) Erfahrungen bei der Züchtung eines einhäusigen Hanfes. In: Tagungsband I. Biorohstoff Hanfsymposium. Frankfurt/Main: 170-87
- [74] Geschwinde T (1996): Rauschdrogen: Marktformen und Wirkungsweisen. 6. Aufl Springer Berlin Heidelberg New York: 9
- [75] Hoffman W, Mudra A, Plarre W (1985) Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Band 2. Spezieller Teil. Paul Parey Verlag. Berlin/Hamburg: 344-9
- [76] Bocsa I (1995) Die Hanfzüchtung in Ungarn: Zielsetzungen, Methoden und Ergebnisse. In: Tagungsband I. Biorohstoff Hanfsymposium. Frankfurt/Main: 200-11
- [77] Köhler D (1958) Die Entwicklung von *Cannabis sativa* unter dem Einfluss verschiedener Tageslängen. Physiol Plantarum Kopenhagen 11: 249-59
- [78] Petri G, Oroszlan P, Fridvalszy L (1988) Histochemical detection of hemp trichomes and their correlation with the THC content. Acta Biol Hung 39: 59-73
- [79] Mahlberg PG, Kim ES (2001) THC accumulation in glands of *Cannabis* (Cannabinaceae). Hemp Report 3
- [80] Mahlberg PG, Kim ES (2004) Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabinaceae). Journal of Industrial Hemp 9(1): 15-36
- [81] van der Werf HMG (1994) Crop physiology of fibre hemp *Cannabis sativa* L. Dissertation. Universität Wageningen
- [82] Frank W (1996) Hanf & Co.: Die Renaissance der heimischen Faserpflanzen. Katalyse-Institut für angewandte Umweltforschung. Göttingen. Verlag die Werkstatt

- [83] Small E (1977) The species problem in *Cannabis*. Vol 1-2. Toronto. Emboden WA (1977) Narcotic Plants. New York
- [84] Kessler T (1985) *Cannabis Helvetica*. Sabalitschka T (1926) Über *Cannabis Indica*. Insbesondere über eine Gewinnung hochwertiger Herba *Cannabis Indicae* durch Kultur in Deutschland. Hitzemann W (1941) Untersuchungen auf Haschisch bei verschiedenen Hanfsorten eigenen Anbaus in Deutschland. Arch Pharmaz: 279
- [85] Munson AE, Fehr K (1983) Immunological effects of *Cannabis*: *Cannabis* and health hazards. 84: 257-353
- [86] Korte F, Sieper H (1965) New results on hashish-specific constituents. Bull Narcotics 17: 35-43
- [87] Obata Y, Ishikawa Y (1966) Studies on the constituents of hemp plant. Agr Biol Chem 30: 619-20
- [88] Gill EW, Paton WD, Pertwee RG (1970) Preliminary experiments on chemistry and pharmacology of *Cannabis*. Nature (Lond) 228: 134-6
- [89] Farnsworth NR (1969) Pharmacognosy and chemistry of *Cannabis sativa*. J Arm Pharm Assoc 9: 410-4
- [90] Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG (1980) Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. J Nat Prod 43: 169-234
- [91] Zajicek J, Fox P, Sanders H et al (2003) Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study) multicentre randomised placebo-controlled trial. Lancet 362: 1517-26
- [92] Juel-Jensen BE (1972) *Cannabis* and recurrent herpes simplex. BMJ 835: 296
- [93] Berdyshev EV (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. Chem Phys Lipids 108: 169-90
- [94] Friedmann H, Klein TW, Newton C, Daaka Y (1995) Marijuana, receptors and immunomodulation. Adv Exp Med Biol 373: 103-13
- [95] Klein TW, Newton C, Friedmann H (1998) Cannabinoid receptors and immunity. Immunol Today 18: 373-81
- [96] Vannaci A, Gianni L, Passani MB, Di Felice A, Pierpaoli S, Zagli G, Fantappie O, Mazzanti R, Masini E, Mannaioni PF (2004) The endocannabinoid 2-arachidonyl-glycerol decreases the immunological activation of Guinea pig mast cells: involvement of nitric oxide and eicosanoids. J Pharmacol Exp Ther 311: 256-64
- [97] Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S, Starowicz K, Steuder R, Schlicker E, Cravatt B, Mechoulam R, Buettner R, Werner S, Di Marzo V, Tuting T, Zimmer A (2007) Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. Science 316: 1494-7
- [98] Kraft B, Kress HG (2004) Cannabinoide und Immunsystem. Menschen, Mäuse und Zellen. Schmerz 2004. 18: 203-10
- [99] Bidhaut-Russel M, Devane WA et al (1990) Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. J Neurochem 55: 21-6
- [100] Fernandez-Ruz J, Hernandez M, Ramos JA (2010) Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. CNS Neurosci Ther 16: 72-91
- [101] Wegener N, Koch M (2009) Neurobiology and systems physiology of the endocannabinoid system. Pharmacopsychiatry 42 (Suppl 1): 79-86
- [102] Rieder SA, Chauhan A, Singh U et al. (2010) Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. Immunobiology 215: 598-605
- [103] Hussein L, Leussink VI, Warnke C, Hartung H-P, Kieseier BC (2011) Cannabinoide zur symptomatischen Therapie der Multiplen Sklerose. Der Nervenarzt 2011. Springer-Verlag. Düsseldorf: 1-8

- [104] Fetterman PS, Keith ES, Waller CW, Guerrero O, Doorenbos J, Quimby MW (1971) Mississippi-grown *Cannabis sativa* L.: Preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in THC content versus age, sex and plant part. J Pharm Sci 60: 1246-9
- [105] Avico U, Pacifici R, Zuccaro P (1985) Variations of THC content in *Cannabis* plants to distinguish the fibre-type from drug-type plants. Bull Narc 37: 61-5
- [106] de Meijer EPM, van der Kamp HJ, van Eeuwijk FA (1992) Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. Euphytica 62: 187-200
- [107] Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B (2004) Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 378: 183-9
- [108] Murari G, Lombardi S, Puccini AM, De Sanctis R (1983) Influence if environmental conditions on THC in different cultivars of *Cannabis sativa* L. Fitoterapia 54: 195-201
- [109] O'Shaugnessy WB (1986) Monographie von Dr. Raphael Mechoulam. Universität Jerusalem. Weizmann-Institut (Tel Aviv) 1964–1984
- [110] Gaoni Y, Mechoulam R (1964): Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. In: Journal of the American Society. 86(8): 1646-7
- [111] Ross SA, Mehmedic Z, Murphy TP, Elsohly MA (2000) GC-MS analysis of the total THC content of both drug- and fibre-type *Cannabis* seeds. J Anal Toxicol 24: 715-7
- [112] Verordnung (EG) Nr. 1420/98 zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 619/71 zur Festlegung der Grundregeln für die Gewährung einer Beihilfe für Flachs und Hanf (1998) ABI. EU L 190: 7-8
- [113] Mediavilla V, Derungs R, Känzig A, Mägert A (1997) Qualität von Hanfsamenöl aus der Schweiz. Agrarforschung 4: 449-51
- [114] Wolke W (1995) *Cannabis* Handbuch: 85
- [115] Axelrod J, Felder CC (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonist anandamide. Neurochem Res 23(5): 575-81
- [116] Cohen S, Stillman RC, Mikuriya TH (1973) Therapeutic Potential of Marijuana. UCLA. Marijuana Medical Papers 1839–1972. Medi Comp Press Oakland CA
- [117] Rhein RWJr (1980) Marijuana therapy. Medical World News 28: 39-49
- [118] Editorial (1980) Marijuana for nausea and vomiting due to cancer chemotherapy. Med Lett 22: 41
- [119] Sallan SE, Zinberg NE, Frei E (1975) Antiemetic effect of delta-9-THC in patients receiving cancer chemotherapy. N Engl J Med 293: 795
- [120] Hermann TS, Einhorn LK, Jones SE et al (1979) Superiority of nabilone over prochlorperazine as an antiemetic in patients receiving cancer chemotherapy. N Engl J Med 300: 1295
- [121] Chang AE, Shiling DJ, Stillman RC et al (1979) Delta-9-THC as an antiemetic in cancer patients receiving high-dose methotrexate. Ann Intern Med 91: 812
- [122] Frytak S, Moertel CG, O'Fallon JR et al (1979) Delta-9-THC as an antiemetic for patients receiving cancer chemotherapy. Ann Intern Med 91: 825
- [123] Lucas VS, Laszlo J (1980) Delta-9-THC for refractory vomiting induced by cancer chemotherapy. JAMA 243: 1241
- [124] Novotna A, Mares J, Ratcliffe S et al (2011) A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex*), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. Eur J Neurol 18: 1122-31
- [125] Kubajewska I, Constantinescu CS (2010) Cannabinoids and experimental models of multiple sclerosis. Immunobiology 215: 647-57

- [126] Russo E, Guy GW (2006) A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypothesis* 66: 234-46
- [127] Williamson EM, Evans FJ (2000) Cannabinoids in clinical practise. *Dfugs*. 60(6): 1303-14
- [128] Hii SW, Tam JD, Thompson BR, Naughton MT (2008) Bullous lung disease due to marijuana. *Respirology* 13(1): 122-7
- [129] Wu TC, Tashkin DP, Djahed B, Rose JE (1998) Pulmonary hazards of smoking marijuana as compared with tobacco. *N Engl J Med* 318: 347-51
- [130] Fligiel SE, Roth MD, Kleerup EC, Barsky SH, Simmons MS et al (1997) Tracheobronchial histopathology in habitual smokers of cocaine, marijuana and/or tobacco. *Chest* 112: 319-26
- [131] Fligiel SE, Venkat H, Gong HJr, Tashkin DP (1988) Bronchial pathology in chronic marijuana smokers: A light and electron microscopic study. *J Psychoactive Drugs* 20: 33-42
- [132] Gong HJr, Fligiel SE, Tashkin DP, Barbers RG (1987) Tracheobronchial changes in habitual, heavy smokers of marijuana with and without tobacco. *Am Rev Respir Dis* 136: 142-9
- [133] Baldwin GC, Tashkin DP, Buckley DM et al (1997) Habitual smoking of marijuana and cocaine impairs alveolar macrophage function and cytokine production. *J Resp Crit Care Med* 156: 1606-13
- [134] Sherman MP, Roth MD, Gog JJr, Tashkin DP (1991) Marijuana smoking, pulmonary function and lung macrophage oxidant release. *Pharmac Biochem Behav* 40: 663-9
- [135] Khalsa JH, Genser S, Francis H, Martin B (2002) Clinical consequences of marijuana. *J Clin Pharmacol* 42(Suppl): 75-105
- [136] Tashkin DP, Baldwin GC, Sarafian T, Dubinett S, Roth MD (2002) Respiratory and immunologic consequences of marijuana smoking. *J Clin Pharmacol* 42 (Suppl.): 71S-81S
- [137] Munkhof WJ, Konstantinos A, Wamsley M, Mortlock M, Gilpin C (2003) A cluster of tuberculosis associated with use of a marijuana water pipe. *Int J Tuberc Lung Dis* 7: 860-5
- [138] Ramirez J (1990) Acute pulmonary histoplasmosis: Newly recognized hazard of marijuana plant hunters. *Am J Med* 88: 60N-62N
- [139] Phan TD, Lau KK, Li X (2005) Lung bullae and pulmonary fibrosis associated with marijuana smoking. *Australas Radiol* 49: 411-4
- [140] Cunningham D, Teichtahl H, Hunt JM, Dow C, Valentine R (2000) Necrotizing pulmonary granulomata in a marijuana smoker. *Chest* 2000 117: 1511-5
- [141] Brenneisen R (2004) Pharmakokinetik. In Grotenhermen F: *Cannabis* und Cannabinoide. Verlag Hans Huber. Bern
- [142] Lindgren JE et al (1981) *In Vitro* Glucoronidation of Delta-9-Tetrahydrocannabinol-D3 by UGT2B7, UGT1A10 and UGT1A7 detected using LC/MS-MS. In: PragstnF., Aderjan R: Aktuelle Beiträge zur Forensischen und Klinischen Toxikologie. GTFCH. Bad Vibel
- [143] Ohlsson A et al (1982) Single Dose kinetics of deuterium labelled delta-1-tetrahydrocannabinol in heavy and light *Cannabis* users. *Biomed Mass Spectrom* 9: 6-10
- [144] Lott S (2009) Isotopenverdünnungsmassenspektroskopische Primärmethode zur Analyse von THC im Serum und Prüfung von THC-Glucuronid (THCglu) als Urinmarker für THC im Serum. Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin. Dissertation. Heidelberg: 12
- [145] Schwarz S, Leweling H, Sagstetter B-U, Meinck H-M (2005) *Akt Neurol* 32(4): 208-16

- [146] Johansson E et al (1989) Determination of delta-1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marijuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 3: 35-8
- [147] Kreuz DS, Axelrod J (1973) Delta-9-Tetrahydrocannabinol: Localization in body fat. *Science* 179: 391-3
- [148] Agurell S, Leander K (1971) Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of *Cannabis* (hashish) during smoking. *Acta Pharm Suec* 8: 391-402
- [149] Dietz L (2007) Elimination des 11-Nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinols sowie Bildung und Elimination seines Glucuronids nach intravenöser Applikation. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität. Heidelberg
- [150] Wall ME et al (1983) Metabolism, disposition and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther* 34: 352-63
- [151] Wade DT (2003) A preliminary controlled study to determine whether whole-plant *Cannabis* extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clin Rehabil* 17: 18-26. Mikuriya TH (2004) *Cannabis* as a substitute for alcohol: a harm reduction approach. *J Cannabis Therapeutics* 2: 121-33
- [152] Agurell S, Halldin M, Lindgren JE et al (1986) Pharmacokinetics and metabolism of delta-1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev* 38: 21-43
- [153] Huestis MA, Sampson AH, Holicky BJ et al (1992) Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin Pharmacol Ther* 52: 31-41
- [154] Adams IB, Martin BR (1996) *Cannabis*: Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91(11): 1585-1614
- [155] Siebte Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften (1996) BGBI I 562
- [156] Leson G, Pless P, Grotenhermen F, Kalant H, El Sohly MA (2001) Evaluating the impact of hemp food consumption on workplace drug tests. *J Anal Toxicol* 25: 691-8
- [157] Mölleken H, Husmann H (1997) Cannabinoids in seed extracts of *Cannabis sativa* cultivars. *Journal of the International Hemp Association* 4(2): 73, 76-9
- [158] BfR (1997) Einsatz von Hanf in Lebensmitteln kann gesundheitlich problematisch sein. BgVV Pressedienst. Berlin
- [159] Karus M (2003) Neue THC-Richtwerte für Hanflebensmittel in Deutschland. Nova-Institut Kapitel 1-5: 2000, Kapitel 6: 2003
- [160] Grotenhermen F, Karus M (1998) Industrial hemp is not marijuana: Comments on the drug potential of fiber *Cannabis*. *J Intern Hemp Assoc* 5: 96-101
- [161] De Padua LS, Bunyaprafatsara N, Lemmens RHMJ (1999) Plant resources of south-east Asia. Medicinal and poisonous plants. Leiden Backhuys Publishers No 12 Vol 1
- [162] Mölleken H (1999) Hanf (*Cannabis sativa*) als Novel Food. *Bioforum* 7-8: 452-7
- [163] Leizer C, Ribnicky D, Poulev A, Dushenkov S, Raskin I (2000) The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *J Nutraceut Funct Med Foods* 2: 35-53
- [164] Franke W (1997) Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- [165] Callaway J, Schwab U, Harwima I, Halonen P, Mykkänen O, Hyvönen P, Järvinen T (2005) Efficacy of dietary hempseedoil in patients with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment* 16: 87-94
- [166] Strunz U, Jopp A (2002) Fit mit Fett – Gute Fette von Killerfetten unterscheiden. Wilhelm Heyne Verlag München
- [167] Matthäus B, Brühl L, Kriese U, Schumann E, Peil A (2001) Hanföl: ein „Highlight“ für die Küche. *Forschungsreport* 2: 22-5

- [168] St. Angelo AJ, Conkerton JM, Dechary JM und Altschul AM (1966) *Biochimica et Biophysica Acta*, Bd. 121: 181ff. St. Angelo AJ, Yatsu LY und Altschul AM (1966) *Archives of Biochemistry*, Bd. 124: 199–205. Stockwell DM, Dechary JM und Altschul AM (1964) *Biochimica et Biophysica Acta*. Bd. 82: 221
- [169] Johnson P (1999) Industrial hemp: A critical review of claimed potentials for *Cannabis sativa*. *TAPPI J* 82: 113-23
- [170] McKenny M (1939) *Birds in the Garden*. Reynal 6 Hitchcock New York
- [171] Schönefeld H (1955) Stand des Wissens bei Hanf: 25
- [172] Hofbauer B (1999) *Der Hanf als Ölpflanze*. Seminararbeit. Wien
- [173] Dewey L (1993) *USDA Yearbook 1913*. Washington 1914
- [174] Mißbach A (1938) *Die deutschen Spinnstoffe*
- [175] Conrad C (1993) *Hemp, lifeline for the future*. Creative Xpressions Publishing. Los Angeles California
- [176] Harmsen P (1991) *Hemp paper for consortium proposal*. Tasmania
- [177] Dewey LH, Merrill JL (1916) im Bulletin Nr. 404 des US-Landwirtschaftsministeriums
- [178] Frazier J (1974) *The marijuana farmers*. Solar Age Press New Orleans Louisiana. US-Kongressbibliothek, Nationalarchive
- [179] Schiller T (2011) *Erfindung des Papiers – Typografie*: 91 und Karus M (1995) *Hanf – Ökorohstoff mit Zukunft? Hanf in Deutschland – Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft*. In: Tagungsband 1. Biorohstoff Hanfsymposium. Frankfurt/Main: 117-37
- [180] Herer J (2004) *Die Wiederentdeckung der Nutzpflanze Cannabis Marihuana*: 271, 287
- [181] Waskow F (1995) *Hanf & Co. Die Renaissance der heimischen Faserpflanzen*. Katalyse-Institut für angewandte Umweltforschung. Verlag die Werkstatt. AOL-Verlag: 59
- [182] v. Pirquet C (1906) *Allergie*. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 30: 1457-8
- [183] Ring J (2007) *Angewandte Allergologie*. 3. Aufl. Medien und Medizin Verlag München: 16
- [184] Coombs R, Gell P (1963) *The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical aspects of immunology* Davis Philadelphia: 317
- [185] Liechtenstein LM (1993) *Allergie und Immunsystem*. In: *Spektrum der Wissenschaft: Immunabwehr*. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin Oxford: 100-9
- [186] Wüthrich B (1986) *Nahrungsmittelallergien*. *Internist* 27: 362-71 und (1993) *Zur Nahrungsmittelallergie*. *Allergologie* 16: 280-7
- [187] Janeway CA, Travers P (1995) *Immunologie*. Spektrum Verlag. Heidelberg
- [188] Gremmel S (2007) *In vitro Untersuchungen des allergenen Potenzials von technologisch verändertem Hühnerei*. Dissertation: 8
- [189] Bischoff SC, Manns MP (2001) *Food allergies*. *Der Internist* 42: 1108-17
- [190] Schäfer T, Breuer K (2003) *Epidemiology of food allergies*. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie und verwandte Gebiete* 54: 112-20
- [191] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- [192] Read SM, Northcote DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye binding assay for protein. *Anal Biochem* 116: 53-64
- [193] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- [194] Guttman A (1996) *Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins*. *Electrophoresis* 17: 1333-41

- [195] Wigotzki M (2001) Einfluss der technologischen Verarbeitung auf das allergene Potenzial der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuss, Apfel und Karotte. Hamburg. Dissertation: 19
- [196] Westermeier R (1990) Elektrophorese-Praktikum. VCH-Verlag. Weinheim
- [197] Heukeshoven J, Dernick R (1986) Silberfärbung. Radola BJ (ed) Elektrophoreseforum 1986 TU München: 22-7
- [198] Fling PS, Gregerson DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by using a highmolarity tris-buffered system without urea. *Anal Biochem* 155: 83-8
- [199] Tobwin H, Gordon J (1984) Immunoblotting and dot blotting – current status and outlook. *J Immunol Meth*: 72: 3131-40
- [200] Aalbersee RC (2000) Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*: 106: 228-38
- [201] Handman E, Jarvis HM (1985) Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: Mechanism of binding to nitrocellulose. *J Immunol Meth* 83: 113-23
- [202] Stott DI (1989) Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* 119: 153-87
- [203] Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Technol* 1: 3-11
- [204] Ahlroth K, Alenius H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T (1995) Crossreacting allergens in natural rubber latex and avocado. *J Allergy Clin Immunol* 96: 167-73
- [205] Blake MS et al (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Westernblots. *Anal Biochem* 136: 175-9
- [206] Yman L et al (1975) RAST-based allergen assay methods. *Dev Biol Stand* 29: 151-65
- [207] Möller M, Paschke A, Vieluf D, Kayma M, Vieths S, Steinhart H (1997) Characterization of allergens in kiwi fruit an detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen an related fruit allergens. *Food Agric Immunol* 9: 107-21
- [208] Ring J (1989) Nahrungsmittelallergien und andere nahrungsmittelbedingte Unverträglichkeitsreaktionen. *Akt Ernährung* 14: 49-56
- [209] Chandra RK (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: A selective review. *Am J Clin Nutr* 66: 526S-9S
- [210] Andre F, Andre C, Colin L, Cacaraci F, Cavagna S (1994) Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* 93: 77-83
- [211] Aulepp H, Vieths S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Dtsch Lebensm Rundsch* 88: 171-9
- [212] Spiewak R, Gora A, Dutkiewicz J (2001) Work-related skin symptoms and type I allergy among eastern-Polish farmers growing hops and other crops. *Ann Agric Environ Med* 8(1): 51-6
- [213] Stadtmauer G, Beyer K, Bardina L, Sicherer SH (2003) Anaphylaxis to ingestion of hempseed (*Cannabis sativa*). *J Allergy Clin Immunol* 112: 216-7
- [214] Lewis CR, Raymond GS (1975) Allergy to marihuana: A clinical and skin-testing study. *J Allergy Clin Immunol Vol* 55: 131-2
- [215] Freeman GL (1983) Allergic skin test reactivity to marijuana in the Southwest. *West J Med* 138(6): 829-31
- [216] Stokes JR, Hartel R, Ford LB, Casale TB (2000) *Cannabis* (hemp) positive skin tests and respiratory symptoms. *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(3): 238-40
- [217] Majmudar V, Azam NA, Finch T (2006) Contact urticaria to *Cannabis sativa*. *Contact Dermatitis* 54(2): 127

- [218] Williams C, Thompstone J, Wilkinson M (2008) Work-related contact urticaria to *Cannabis sativa*. *Contact Dermatitis* 58(1): 62-3
- [219] Lindemayr H, Jäger S (1980) Beruflich erworbene Typ I-Allergie durch Hanfpollen und Haschisch. *Dermatosen* 28 Nr. 1
- [220] Zuskin E, Mustajbegovic J, Schachter EN (1994) Follow-up study of respiratory function in hemp workers. *Am J Ind Med* 26(1): 103-15
- [221] Fishwick D, Allan LJ, Wright A, Barber CM, Curran AD (2001) Respiratory symptoms, lung function and cell surface markers in a group of hemp fiber processors. *Am J Ind Med* 39: 419-25
- [222] Vidal C, Fuente R, Iglesias A, Saez A (1991) Bronchial asthma due to *Cannabis sativa* seed. *Allergy* 46(8): 647-9
- [223] Herzinger T, Schöpf P, Przybilla B, Rueff F (2011) IgE-Mediated hypersensitivity reactions to *Cannabis* in laboratory personnel. *Int Arch Allergy Immunol* 156: 423-6
- [224] Anibarro B, Fontela JL (1996) Allergy to marihuana. *Allergy* 51(3): 200-1
- [225] Perez JAJr (2000) Allergic reaction with intravenous marijuana use. *J Emerg Med* 18(2): 260-1
- [226] Kagen SL, Kurup VP, Sohnle PG, Fink JN (1983) Marijuana smoking and fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 71(4): 389-93
- [227] Llewellyn GC, Orear CE (1977) Examination of fungal growth and aflatoxin production on marihuana. *Mycopathologica* 62: 109
- [228] Chusid MJ, Gelfand JA, Nutter C, Fauci AS (1975) Pulmonary aspergillosis, inhalation of contaminated marijuana smoke, chronic granulomatous disease. *Ann Intern Med* 82: 682
- [229] Llamas R, Hart DR, Schneider NS (1978) Allergic bronchopulmonary aspergillosis associated with smoking moldy marijuana. *Chest* 73: 871
- [230] Kagen SL, Sohnle PG, Kurup VP, Fink JN (1981) Aspergillus: an inhalable contaminant of marijuana. *N Engl J Med* 304: 483
- [231] Yocum MW, Saltzman AR, Strong DM et al (1976) Extrinsic allergic alveolitis after *Aspergillus fumigatus* inhalation. *Am J Med* 61: 939
- [232] Prystowsky SD, Vogelstein B, Ettinger DS et al (1976) Invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 195: 655
- [233] Munchhof WJ, Konstantinos A, Wamsley M, Mortlock M, Gilpin C (2003) A cluster of tuberculosis associated with the use of a marijuana water pipe. *Int Tuberc Lung Dis* 7: 860-5
- [234] Kurup VP, Resnick A, Kagen SL, Cohen S, Fink JN (1983) Allergenic fungi and actinomycetes in smoking materials and their health implications. *Mycopathologica* 82: 61-4
- [235] de Larramendi CH, Carnes J, Garcia-Abujeta JL, Garcia-Endrino A, Munoz-Palomino E, Huertas AJ, Fernandez-Caldas E, Ferrer A (2008) Sensitization and allergy to *Cannabis sativa* leaves in a population of tomato (*Lycopersicon esculentum*)-sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 146: 195-202
- [236] Raharjo TJ, Widjaja I, Roytrakul S, Verpoorte R (2004) Comparative proteomics of *Cannabis sativa* plant tissues. *J Biomol Tech* 15(2): 97-106
- [237] Tanaka H, Degawa M, Kawata E, Hayashi J, Shoyama Y (1998) Identification of *Cannabis* pollens using an allergic patient's immunoglobulin E and purification and characterization of allergens in *Cannabis* pollens. *Forensic Sci Int* 97(2-3): 139-53
- [238] de Larramendi CH, Carnes J, Garcia-Abujeta JL, Garcia-Endrino A, Munoz-Palomino E, Huertas AJ, Fernandez-Caldas E, Ferrer A (2008) Sensitization and allergy to *Cannabis sativa* leaves in a population of tomato (*Lycopersicon esculentum*)-sensitized patients. *Int Arch Allergy Immunol* 146(3): 195-202

- [239] Menz G, Dolecek C, Schönheit-Kenn U, Ferreira F, Moser M, Schneider T, Suter M, Boltz-Nitulescu G, Ebner C, Kraft D, Valenta R (1996) Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant bet v I, the major birch pollen allergen. *Clinical and Experimental Allergy* Volume 26: 50-60
- [240] Hecker J (2011) Charakterisierungen originärer IgE-Epitope der Majorallergene Bet v 1 und Phl p 5 durch Interaktionsanalysen mit rekombinanten humanen Antikörpern. Dissertation. Hamburg
- [241] Mayoral M, Calderon H, Cano R, Lombardero M (2008) Allergic rhinoconjunctivitis caused by *Cannabis sativa* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol* Volume 18(1): 71-7
- [242] Pajaron Fernandez MJ, Bartolome B, Orts Jimenez D, Carnero Gonzalez L, Canto Vizcaino E, Aldecoa Martinez MD (2005) Alergia a planta de marihuana (abstract) *Allergol Immunol Clin* 20 (extra 2): 186
- [243] Morales Rubio C, Dura Calatayud M, Bartolome B, Pelaez Hernandez A, Mencia Sanchez G, Ojeda Gonzalez L (2006) Alergia a planta de *Cannabis sativa* (abstract) *J Investig Allergol Clin Immunol* 16 (suppl 2): 112-3
- [244] Armentia A, Castrodza J, Ruiz-Monoz P, Martinez-Quesada J, Postigo I, Herrero M, Gonzalez-Sagrado M, de Luis D, Martin-Armentia B, Guisantes JA (2011) Allergic hypersensitivity to *Cannabis* in patients with allergy and illicit drug users. *Allergol Immunopathol (Madr)* 39(5): 271-9
- [245] Vieths S, Schöning B, Brockmann S, Aulepp H (1992) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch Lebensm Rundsch* 88: 239-43 + 254-6
- [246] Vieths S, Schöning B, Baltes W (1992) Allergy to fruits and vegetables in pollen sensitive patients: Allergen characterization by IgE immunoblotting and peroxidase staining. *Food Agric Immunol* 4: 181-97
- [247] Yman L, Ponterius G, Brandt R (1975) RAST-based allergen assay methods. *Dev biol Standard*. Basel 29: 151-65. van Hage-Hamsten J (1987) *Clin Allergy* 17: 23-31

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.	Thema	Seite
1	Anbauflächen von Faserhanf in der EU zwischen 1993 und 2004	15
2	Morphologie der <i>Cannabis</i> -Pflanze	17
3	Strukturformeln von THC und CBD	20
4	Nutzungsdiagramm von Hanf	25
5	Silberfärbung des Proteinmusters aus <i>Cannabis</i> -Blatt-, -Blüten und -Samenextrakt	44
6	CBB-Färbung des Proteinmusters aus <i>Cannabis</i> -Blatt-, -Blüten und -Samenextrakt	45
7	Abschätzung der Molekulargewichte von Proteinen aus <i>Cannabis</i> -Blattextrakt durch graphische Ableitung	46
8	Immunoblot mit <i>Cannabis</i> -Blattextrakt	48
9	Immunoblot mit <i>Cannabis</i> -Blütenextrakt	49
10	Immunoblot mit <i>Cannabis</i> -Blatt- und Blütenextrakt	50
11	Immunoblot mit <i>Cannabis</i> -Samenextrakt	51
12	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blätter und <i>D. pter.</i>	58
13	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blüten und <i>D. pter.</i>	59
14	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blätter und Gräser	60
15	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blüten und Gräser	60
16	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blätter und Birke	61
17	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blüten und Birke	62
18	Korrelationsmatrix spezifischer IgE gegen <i>Cannabis</i> -Blüten und -Blätter	63
19	Inhibition des Gräserpollen-CAP durch Gräserpollen- und <i>Cannabis</i> - Blütenextrakt mit Patientenserum Nr. 1	65
20	Inhibition des Gräserpollen-CAP durch Gräserpollen- und <i>Cannabis</i> - Blütenextrakt mit Patientenserum Nr. 7	65
21	Inhibition des Birkenpollen-CAP durch Birkenpollen- und <i>Cannabis</i> - Blütenextrakt mit Patientenserum Nr. 1	66
22	Inhibition des Birkenpollen-CAP durch Birkenpollen- und <i>Cannabis</i> - Blütenextrakt mit Patientenserum Nr. 7	67
23	Inhibition des <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP durch <i>Cannabis</i> -Blüten- oder Gräserpollen- oder Birkenpollenextrakt mit Patientenserum Nr. 1	68
24	Inhibition des <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP durch <i>Cannabis</i> -Blüten- oder Gräserpollen- oder Birkenpollenextrakt mit Patientenserum Nr. 7	68
25	Inhibition des <i>Cannabis</i> -Blüten-CAP durch <i>Cannabis</i> -Blüten- oder Gräserpollen- oder Birkenpollen- oder <i>Cannabis</i> -Samenextrakt mit Patientenserum Nr. 13	69

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle Nr.	Thema	Seite
1	Exogene und endogene Cannabinoide	19
2	Pharmazeutische Produkte mit Cannabinoid-Rezeptor-Wirkung	21
3	THC-Grenzwerte in Nahrungsmitteln	23
4	Standard-Allergene (CAP-FEIA)	37
5	Einteilung der CAP-Klassen	37
6	Übersicht über das Patientenkollektiv	40
7	Charakteristika der Patienten aus Gruppe A	41
8	Charakteristika der Patienten aus Gruppe B	42
9	Charakteristika der Patienten aus Gruppe C	42
10	Charakteristika der Patienten aus Gruppe D	42
11	Proteingehalte der <i>Cannabis</i> -Extrakte	43
12	Extrapolation der Molekulargewichte silbergefärbter Proteine aus <i>Cannabis</i> -Blättern, -Blüten und -Samen	47
13	Kongruente MG der Proteine aus <i>Cannabis</i> -Blättern, -Blüten und -Samen	47
14	Detektion von <i>Cannabis</i> -Allergenen im IB durch spezifische IgE einzelner Seren	51
15	Erkennung von Banden im IB durch Seren der Gruppen A-C	53
16	Muster der Allergenerkennung in <i>Cannabis</i> -Extrakten im IB	54
17	Kongruenz der Ergebnisse von IB und CAP-FEIA	54
18	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene aus <i>Cannabis</i> -Blättern	55
19	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene aus <i>Cannabis</i> -Blüten	55
20	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene von <i>D. pteronyssinus</i>	56
21	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Allergene einer Mischung von Pollen frühblühender Gräser	56
22	Spezifische IgE-Antikörper im Serum gegen Birkenpollenantigene	57
23	Detektierte IgE-bindende <i>Cannabis</i> -Allergene	77
24	Konfiguration der Slots in den Trenngelen	93
25	Konfiguration der Slots im Transfergel	93
26	Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers	93
27	Protokoll der Silberfärbung	95
28	Pipettierschema der CAP-Inhibition von Gräserpollen (Serum Nr. 1 und Nr. 7)	103
29	Pipettierschema der CAP-Inhibition von Birkenpollen (Serum Nr. 1 und Nr. 7)	104
30	Pipettierschema der CAP-Inhibition von <i>Cannabis</i> -Blüten (Serum Nr. 1 und Nr. 7)	105
31	Pipettierschema der CAP-Inhibition von <i>Cannabis</i> -Blüten (Serum Nr. 13)	106
32	Charakteristika der Patientenseren	107

9. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Bernhard Przybilla für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine wohlwollende, ausdauernde Beratung und richtungsweisenden Anregungen beim Entstehen dieser Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Professorin Dr. med. Franziska Ruëff für ihre engagierte Betreuung bei der Durchführung der Experimente, ihre praktischen Ratschläge und die fruchtbaren Ideen, mit der sie wesentlich zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein herzlichster Dank geht an Frau Gabi Weimer, die mich geduldig und freundlich in die entsprechenden Arbeitstechniken eingeführt und durch ihre tatkräftige und aufmunternde Unterstützung meine Arbeit stets aufs Neue beflügelt hat.

Danken möchte ich auch Frau Sonja Maier für ihre andauernde freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Günther Heubl (Fakultät für Biologie), der die mikroskopische Untersuchung des *Cannabismaterials* übernommen und dessen Kontamination mit Pilz(spor)en und Fremdpollen ausgeschlossen hat.

Zu danken habe ich auch Herrn Christoph Bernau vom Institut für Medizinische Informationsberatung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München für die statistische Beratung.

Abschließend möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Sonja Gassner für die gute und freundliche Zusammenarbeit, die vielen motivierenden Worte, die bereitwillige, unermüdliche Tatkraft und die kritische Durchsicht des Methodenskripts bedanken.

*„Manchmal denkst du: Nur noch der nächste Schritt geht.
Wenn du das oft genug gedacht hast, hast du's auf einmal geschafft!“
(Gabriele Weimer)*